

UNIVERSITE DE MONTPELLIER

FACULTE DES SCIENCES

T H E S E

présentée à la Faculté des Sciences de Montpellier
en vue d'obtenir le grade de Docteur ès-Sciences Physiques

APPLICATION DE LA MESURE DES COEFFICIENTS
DE SELF-DIFFUSION A L'ETUDE DES INTERACTIONS
ENTRE LES PROTEINES ET LES IONS METALLIQUES.

par

Nicole KAMENKA

Licenciée ès Sciences Physiques
Ingénieur ENSCM

Soutenue le Décembre 1970 devant la Commission d'Examen.

JURY : MM. J. SALVINIEN

Président

M. MOUSSERON

B. BRUN

J. GUASTALLA

Assesseurs

C. SADRON, Professeur au Muséum

Invité

UNIVERSITE DE MONTPELLIER

FACULTE DES SCIENCES

T H E S E

présentée à la Faculté des Sciences de Montpellier
en vue d'obtenir le grade de Docteur ès-Sciences Physiques

APPLICATION DE LA MESURE DES COEFFICIENTS
DE SELF-DIFFUSION A L'ETUDE DES INTERACTIONS
ENTRE LES PROTEINES ET LES IONS METALLIQUES.

par

Nicole KAMENKA

Licenciée ès Sciences Physiques
Ingénieur ENSCM

Soutenue le Décembre 1970 devant la Commission d'Examen.

JURY : MM. J. SALVINIEN

Président

M. MOUSSERON

B. BRUN

J. GUASTALLA

Assesseurs

C. SADRON , Professeur au Muséum

Invité

UNIVERSITE DE MONTPELLIER

FACULTE DES SCIENCES

THESE

Présentée à la Faculté des Sciences de Montpellier
en vue d'obtenir le grade de Docteur en Sciences Physiques

APPLICATION DE LA MESURE DES COEFFICIENTS
DE SELF-DIFFUSION A L'ETUDE DES INTERACTIONS
ENTRE LES PROTEINES ET LES IONS METALLIQUES.

par

Nicolas KAWENKA

Licencié en Sciences Physiques
Inscription N° 2520



Soutenue le 10 Décembre 1970 devant la Commission d'Examen.

JURY : MM. J. SALVINIEN
A. MOUSSEON
E. BRUN
J. GUASTALLA
C. SACHON, Directeur de Thèse

Président
Assesseurs

Doyen : P. DUMONTET

Assesseurs : Ch. SAUVAGE - M. MAURIN

Doyen honoraire : P. MATHIAS

Professeurs honoraires :

R. JACQUES

J. SOULAS

M. CASTERAS

G. DENISOT

E. CARRIERE

J. GRANIER

E. TURRIERE

Ch. BOUHET

Secrétaire Général : E. SIAU

Professeurs titulaires :

M. M. MOUSSERON	Chimie Organique
M. J.P. ROIG	Physique
M. P. CHATELAIN	Minéralogie et Cristallo- graphie
Mle D. TUZET	Zoologie
M. G. COUCHET	Mécanique Supérieure
M. J. SALVINIEN	Chimie-Physique
Mle A.M. VERGNOUX	Physique
M. J. AVIAS	Géologie
M. P. VIELES	Chimie
M. J. RABINOVITCH	Physique (C.S.U. P.)
M. E. KAHANE	Chimie Biologique
M. J.J. MOREAU	Mécanique rationnelle
M. B. CHARLES	Mathématiques pures
M. J. MOTTE	Biologie Végétale
M. R. JOUTY	Physique
M. P. DUMONTET	Physique
M. R. LEGENDRE	Zoologie
M. I. ASSENMACHER	Physiologie Animale
M. A. CASADEVALL	Chimie Organique

M. B. PISTOULET Physique
 M. Ch. ROUMIEU Analyse Supérieure
 M. J. ROBIN Physique
 M. A. POTIER Laboratoire des Acides Minéraux
 M. R. LAFONT Physique
 M. R. JACQUIER Chimie
 M. J. FALGUEIRETTES Minéralogie
 M. J. REGNIER Chimie
 Mme J. CHARLES Mathématiques
 M. P. CAILLON Physique
 M. J. ROUZAUD Chimie
 M. Ch. SAUVAGE Botanique
 M. H. CHRISTOL Chimie (E.N.S.I.)
 Mme G. VERNET Biologie Animale
 M. L. CECCHI Physique
 M. H. ANDRILLAT Astronomie
 M. M. SAVELLI Physique
 M. M. MATTAUER Géologie
 M. L. EUZET Zoologie
 M. C. DELOUPY Physique
 M. L. GRAMBAST Botanique
 M. A. BONNET Botanique
 M. G. LAMATY Chimie
 M. R. MARTY Psychophysiologie

Professeurs sans chaire :

Mme M.L. DE POUQUES Botanique (C.S.U. P.)
 M. P. MURAOUR Géophysique Appliquée
 M. G. TOURNE Chimie
 M. J. REMY Géologie
 M. P. DEMANGEON Géologie
 Mme S. ROBIN Physique
 Mme Ch. DUBOUL-RAZAVET Géologie (C.S.U. P.)

M. E. GROUBERT Physique
 Mme H. GUASTALLA Biologie Physico-Chimique
 M. F. PROUST Géologie
 Mlle A. BAILLETTE Mathématiques (C.S.U. P.)
 M. A. BASSOMPIERRE Physique
 M. M. MAURIN Chimie
 M. N. ROBY Mathématiques
 Mme N. PARIS Physiologie Végétale
 M. J. PARIS Zoologie
 M. R. GAUFRES Chimie
 M. J. SOULIER Chimie (C.S.U. P.)
 M. G. BOUGNOT Physique
 M. R. LENEL Biologie Animale

Professeurs associés :

M. E. AKUTOWICZ Mathématiques
 M. A. MICALI Mathématiques
 M. C. VAGO Biologie Animale
 M. K. KOHLER Biochimie

Maîtres de Conférences :

M. P. MOLIND Mathématiques
 M. Y. GUITTON Physiologie Végétale (C.S.U. P.)
 M. G. BOMBRE Physique (C.S.U. P.)
 M. C. PUISSEGUR Biologie Animale (C.S.U. P.)
 M. P. VIALLET Chimie (C.S.U. P.)
 M. J.M. MORETTI Chimie
 M. L. THALER Géologie
 M. J. LEGRAND Physiologie Animale
 M. M. ROUZEYRE Physique
 M. P. SABATIER Mathématiques
 M. Ch. CASTAING Mathématiques
 M. J.D. BAYLE Physiologie Animale

Mme M. HAKIM Mathématiques
M. R. HAKIM Mathématiques
M. M. BAUSSET Mathématiques (C.S.U. P.)
M. G. LOUPIAS Mathématiques
M. G. MASCHERPA Chimie
M. C. GOUT Physique
M. R. JONARD Botanique
M. F. LAPSCHER Physique
M. C. COMBES Zoologie (C.S.U. P.)
M. B. BRUN Chimie Physique
M. M. DENIZOT Biologie Végétale
M. L. KAISER Physique (C.S.U. P.)
M. L. GIRAL Chimie
M. A. COMMEYRAS Chimie
M. M. AMANIEU Sciences et Techniques de l'Eau
(Hydrobiologie et Mariculture)
M. J. CROUZET Sciences et Techniques Alimentation

Maître de Conférences associé :

M. Y. CORMARY Géologie
M. Y. PIETRASANTA Chimie

Chargés d'enseignement :

M. M. LEFRANC Mathématiques
M. R. MARTY Mathématiques

INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE

Professeur titulaire :

M. R. CORRIU Chimie

Maître de Conférences :

M. CANO Physique
M. FILLARD Physique

M. GARCIA Métallurgie-Génie Mécanique
M. J.P. TRILLES Biologie
M. G. BOURDURE Physique
M. L. LASSABATERE Electricité - Electronique
M. G. LECOY Génie Electrique

Maître de Conférences associé :

M. JOUANNA Génie Civil

Chargé d'enseignement :

M. ESCOUFIER Mathématiques

A la mémoire de mon père

A tous ceux qui me sont chers.

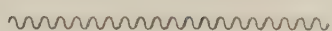
A MES MAITRES

Monsieur le Professeur J. SALVINIEN
Professeur à la Faculté des Sciences de MONTPELLIER

Monsieur le Professeur B. BRUN
Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de MONTPELLIER

En hommage de profonde gratitude

--- A V A N T P R O P O S ---



Ce travail a été effectué dans le laboratoire et sous la direction de Monsieur le Professeur SALVINIEN.

Qu'il me soit permis de lui exprimer ma très sincère gratitude pour la confiance qu'il m'a témoignée en toutes circonstances, la bienveillance avec laquelle il a guidé mon travail et la qualité de son enseignement.

Qu'il soit assuré de ma reconnaissance d'avoir pu travailler sous sa direction.

Je remercie Monsieur le Professeur SADRON, Directeur du Centre de Biophysique d'Orléans, Professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle, de me faire l'honneur de juger ce travail. Je lui suis particulièrement reconnaissante de l'intérêt qu'il a témoigné à ces recherches, notamment dans le cadre de la RCP "Interaction entre les cations métalliques et les macromolécules biologiques".

J'adresse à Monsieur le Professeur MOUSSERON, Professeur à la Faculté des Sciences de Montpellier, Directeur de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie, Membre correspondant de l'Académie des Sciences, mes très vifs remerciements pour l'enseignement que j'ai reçu à l'Ecole de Chimie et l'amicale bienveillance qu'il m'a toujours montrée.

Je le remercie d'avoir bien voulu accepter de faire partie de ce Jury.

Je suis particulièrement heureuse de pouvoir remercier Monsieur le Professeur BRUN, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Montpellier, pour son total soutien depuis mon entrée au laboratoire. Il a guidé avec efficacité et enthousiasme mes recherches, je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude.

Je le remercie de l'honneur qu'il me fait en siégeant à ce Jury.

Je remercie Monsieur GUASTALLA, Directeur de recherches au C.N.R.S., de la bienveillance qu'il m'a toujours témoignée en me parrainant dans le cadre du C.N.R.S. et de l'honneur qu'il me fait en siégeant à ce Jury.

Je remercie le C.N.R.S. qui a permis la réalisation matérielle de cette thèse.

L'amitié que j'ai trouvée au sein du laboratoire auprès des chercheurs et des techniciens a facilité la réalisation de ce travail. C'est pour moi un réel plaisir de les en remercier.

--- TABLE DES MATIERES ---



INTRODUCTION	1
CHAPITRE I - LA SELF-DIFFUSION	3
I - Hypothèse fondamentale de FICK - Définition du coefficient de diffusion	3
II - Interprétation cinétique des phénomènes de diffusion...	6
III - Méthode du tube capillaire	8
1 - Principe	8
2 - Cas de la self-diffusion	9
CHAPITRE II - TECHNIQUES EXPERIMENTALES	10
I - Détermination du coefficient de self-diffusion.....	10
1 - Précision	11
2 - Mesure de la radioactivité	12
II - Détermination de la masse volumique et de la viscosité	12
III - Produits utilisés	13
CHAPITRE III - METHODES UTILISEES POUR L'ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES PROTEINES ET LES METAUX	15
I - Méthodes basées sur les changements intervenant dans les propriétés de la substance réagissant avec la macromolécule.....	15
1 - Solubilité	16
2 - Dialyse d'équilibre	16
3 - Ultracentrifugation	17
4 - Coefficient de partage	17
5 - Mesure de la force électromotrice	18
6 - Mesures polarographiques	18
7 - Mesures de conductivité	18
8 - Diffusion	19
9 - Application de la Résonance Magnétique Nucléaire....	20
10 - Détermination du pH par spectrophotométrie	21

II - Méthodes basées sur les changements dans le comportement même de la molécule de protéine.....	22
1 - Potentiométrie	22
2 - Spectrophotométrie	22
3 - Rotation optique et Dichroïsme circulaire	23
4 - Changement dans le coefficient de sédimentation	23
5 - Variation de la mobilité électrophorétique	23
 CHAPITRE IV - METHODE DES COEFFICIENTS DE SELF-DIFFUSION	25
I - Mesure de D_H et D_H^m - Application à la détermination de $\bar{v}$.	25
II - Limites de la méthode	28
1 - Calcul classique d'erreur	28
2 - Discussion	29
3 - Cas des systèmes histidine-ion zinc et imidazole- ion zinc	30
 CHAPITRE V - LA SERUM ALBUMINE HUMAINE	33
I - Etude chimique de la Serum Albumine Humaine	34
1 - Généralités	34
2 - Caractère Amphotère	36
3 - Comportement aux pH acides ou basiques	39
4 - Liaison avec les ions	41
a) Liaison avec les anions	41
b) Liaison avec les cations	42
II - Mesure du coefficient de self-diffusion de la Serum Albumine Humaine	44
 CHAPITRE VI - APPLICATION DE LA METHODE DES COEFFICIENTS DE SELF- DIFFUSION AUX INTERACTIONS ENTRE LA SERUM ALBUMINE HUMAINE ET LES IONS CALCIUM.	46
I - Rappel des travaux déjà effectués.....	46
II - Résultats Expérimentaux	51
1 - Milieu tampon, pH = 4,65, $\Gamma/2 = 0,1$, $t = 25^\circ\text{C}$	52
2 - Milieu tampon, pH = 7,4, $\Gamma/2 = 0,1$, $t = 25^\circ\text{C}$	52
3 - Milieu tampon véronal, pH = 8,6, $\Gamma/2 = 0,1$, $t = 25^\circ\text{C}$	56
III - Discussion	59

CHAPITRE VII - APPLICATION DE LA METHODE DES COEFFICIENTS DE SELF-DIFFUSION A L'ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LE ZINC ET L'ALBUMINE	64
I - Rappel des travaux déjà effectués	64
II - Résultats Expérimentaux	69
I - Etude des interactions entre l'albumine et l'ion zinc à 25°C	69
a) Milieu tampon acétate de sodium-acide acétique, pH = 4	69
b) Milieu tampon acétate de sodium-acide acétique, pH = 6,3	71
c) Milieu tampon acétate de sodium-acide acétique, pH = 7,4	73
d) Milieu tampon véronal, pH = 8,6	75
e) Milieu tampon acétate de sodium-acide acétique, pH = 7,1	76
2 - Etude des interactions entre l'albumine et l'ion zinc à 37°C	80
a) Milieu acétate de sodium-acide acétique, pH=4...	80
b) Milieu acétate de sodium-acide acétique, pH=6...	83
c) Milieu acétate de sodium-acide acétique, pH=7,4.	85
III - Discussion - 1 - Influence de la viscosité	88
a) à 25°C.....	89
b) à 37°C.....	90
2 - Influence du tampon	90
a) Influence du tampon sur l'ion zinc	90
b) Influence du tampon sur l'albumine	91
3 - Nombre de sites liants	94
a) Rappel théorique	94
α) Sites identiques et complètement indépendants	96
β) Sites identiques non indépendants	99
γ) Sites non identiques	100
b) Analyse des données expérimentales	100

a) Milieux tampon acide acétique-acétate de sodium, pH = 6,3; pH = 7,1; pH = 7,4 - t = 25°C	102
B) Milieux tampon acide acétique - acétate de sodium, pH = 6; pH = 7,4; t = 37°C.....	102
c) Interaction électrostatique	108
IV - Etude des systèmes imidazole-ion zinc et histidine-ion zinc par la méthode des coefficients de self-diffusion	109
1 - Etude des interactions entre l'imidazole et l'ion zinc	111
a) Résultats Expérimentaux	111
b) Interprétation de ces résultats	113
2 - Etude des interactions entre l'histidine et l'ion zinc	114
CHAPITRE VIII - INTERACTION ENTRE LE CUIVRE ET LES PROTEINES	116
I - Interaction entre le cuivre et l'Albumine	116
1 - Rappel des travaux déjà effectués	116
2 - Résultats Expérimentaux	118
a) - Milieu tampon acide acétique-acétate de sodium, pH = 5,6, I/2 = 0,2, t = 25°C	118
b) - Milieu tampon acide acétique-acétate de sodium, pH = 5,6, I/2, t = 25°C	119
II - Interaction entre le cuivre et la gélatine	121
CONCLUSION	126
BIBLIOGRAPHIE	128

APPLICATION DE LA MESURE DES COEFFICIENTS
DE SELF-DIFFUSION A L'ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES PROTEINES
ET LES IONS METALLIQUES

--- INTRODUCTION ---
~~~~~

Les protéines ont une grande importance physiologique car elles donnent de nombreuses réactions avec un grand nombre de substances, depuis les ions et les molécules de taille normale jusqu'à des corps plus compliqués tels que d'autres protéines.

L'étude de l'interaction entre les protéines et les molécules simples permet de mieux connaître leurs structures primaire et secondaire et peut donner des renseignements utiles pour aborder des systèmes plus compliqués; ainsi, le problème de l'insolubilisation des protéines, par exemple par les métaux, intéresse non seulement la préparation et la purification des composés protéiques, mais également, se rapproche du domaine si important de l'immunologie où interviennent les interactions spécifiques antigène-anticorps.

Nous avons, dans ce travail, essayé d'appliquer la variation des coefficients de self-diffusion des ions métalliques en présence de protéine à la mise en évidence des complexes ion métallique-protéine. Cette méthode est fort employée au laboratoire et elle a donné des résultats particulièrement intéressants dans le domaine des mélanges binaires, mais, à notre connaissance, elle n'avait jamais été employée en solution diluée pour le problème des interactions entre macromolécules et ions.

Nous rappellerons ci-après les bases théoriques de la self-diffusion et ferons une brève étude critique de la technique de mesure employée, la méthode du tube capillaire.

Nous résumerons les méthodes employées couramment pour étudier ces complexes ion-macromolécule puis énoncerons les propriétés les plus caractéristiques de la protéine choisie, la Sérum Albumine Humaine (S.A.H.) en solution aqueuse diluée. Les systèmes étudiés sont les complexes S.A.H. - ion calcium et S.A.H. - ion zinc. Nous essayerons ensuite de mettre en évidence les groupements supposés actifs de S.A.H. vis à vis des ions envisagés. Nous aborderons l'étude des systèmes S.A.H. - ion cuivre et Gélatine-ion cuivre.





-- CHAPITRE 1 --



LA SELF-DIFFUSION



Avant d'aborder la description des techniques de mesure du coefficient de self-diffusion, rappelons brièvement sa définition et son importance dans de nombreux problèmes.

La diffusion de la matière est l'une des manifestations les plus directes de l'agitation thermique des particules élémentaires, molécules, ions ou atomes. On l'observe dans les gaz, les liquides et les solides. Sous l'influence de cette agitation, chaque composant du système étudié subit un transport global dont l'importance est mesurée par un coefficient de diffusion défini par la première équation de FICK.

La diffusion se produit chaque fois qu'il existe un gradient de concentration, c'est un transport de matière qui a pour effet de le supprimer.

I - HYPOTHESE FONDAMENTALE DE FICK - DEFINITION DU COEFFICIENT DE DIFFUSION

L'hypothèse fondamentale de FICK<sup>(1)</sup> est que la diffusion d'un corps pur A obéit à des lois de même nature que celles qui régissent la propagation de la chaleur dans un conducteur.

Considérons une solution maintenue à température constante, soit  $C = f(x, y, z)$  la concentration en particules diffusantes au point M (x, y, z) et au temps t. (fig. 1).

On appelle  $\vec{G}$  le gradient de concentration au point M et  $dS$  un élément de surface contenant M. Soit  $\vec{\alpha}$  le vecteur unitaire normal à  $dS$ . Le flux de  $\vec{G}$  à travers  $dS$  est donné par :



$$d\phi = \vec{G} \cdot \vec{\alpha} \cdot dS \quad (1)$$

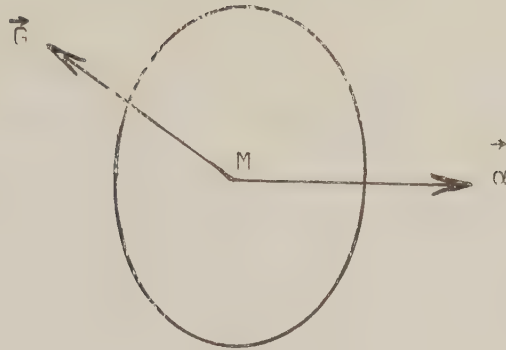


Figure 1

L'hypothèse de FICK revient à poser que la quantité globale  $dq$  de la substance considérée qui traverse  $dS$  pendant le temps  $dt$  est proportionnelle à  $d\phi$ .

$$dq = - D \cdot \vec{G} \cdot dS \cdot \vec{\alpha} \cdot dt \quad (2)$$

L'opposition des signes  $dq$  et  $d\phi$  caractérise la tendance spontanée à l'homogénéisation. Le coefficient de proportionnalité positif  $D$  porte le nom de *coefficient de diffusion*.

Dans le cas d'une diffusion monodimensionnelle suivant l'axe  $Ox$  d'un cylindre de section  $S$ , la relation (2) se réduit à la formule de définition bien connue que l'on appelle souvent *première formule de FICK*.

$$dq = - D \cdot S \cdot \frac{\partial c}{\partial x} \cdot dt \quad (3)$$

De cette équation (3) on peut immédiatement déduire l'équation aux dimensions de  $D$ .

$$D = L^2 T^{-1}$$

$D$  sera exprimé en  $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ .

L'intensité du courant de diffusion, c'est-à-dire le flux suivant la direction normale à la surface unité par unité de temps est :

$$J = - D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (5)$$



Dans l'esprit de *FICK*<sup>(1)</sup> D était indépendant de la concentration. C'était, à une température donnée, une constante caractéristique du corps dissous dans le solvant utilisé.

C'est pourquoi on dit qu'une diffusion obéit à la loi de *FICK* si D est invariable dans les conditions de l'expérience.

En fait de telles conditions ne sont réalisées que dans certains cas d'ailleurs fort importants.

On devra toujours se référer aux équations (2) et (3) pour définir le coefficient de diffusion D, mais elles ne sont généralement pas utilisables pour l'étude mathématique des diffusions observées.

De (2) on déduit par application du théorème d'*OSTROGRADSKY* une forme plus facilement exploitable :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \text{div} (D \cdot \vec{G}) \quad (6)$$

Remarquons que l'équation (6) est obtenue sans qu'aucune hypothèse ne soit faite sur D. Elle fait toujours intervenir le même coefficient de diffusion que l'équation de définition de *FICK*, c'est-à-dire, le coefficient de diffusion vrai ou coefficient différentiel.

C'est l'équation différentielle la plus générale de la diffusion.

Si la diffusion est monodimensionnelle et s'effectue suivant  $Ox$ .

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + D'_c \left( \frac{\partial c}{\partial x} \right) \quad (7)$$

Enfin, supposons que nous nous plaçons dans des conditions expérimentales telles que les variations de D avec la concentration soient négligeables :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (8)$$

L'équation (8) est appelée souvent *équation ou loi de FICK*.





D ne reste rigoureusement constant qu'en *milieu chimiquement homogène*.

## II - INTERPRETATION CINETIQUE DES PHENOMENES DE DIFFUSION

Il est possible d'interpréter les phénomènes de diffusion soit par la seule considération du mouvement thermique particulaire, soit en faisant appel à des forces thermodynamiques plus ou moins fictives.

Rappelons brièvement l'interprétation cinétique des phénomènes de diffusion, l'interprétation thermodynamique ayant été traitée par BRUN<sup>(2)</sup> et SALVINIEN<sup>(3)</sup>.

Dans l'interprétation cinétique on considère que la grandeur caractéristique de l'amplitude du mouvement particulaire est le déplacement quadratique moyen pendant un temps donné. Si  $X$  est le déplacement quadratique moyen pendant l'unité de temps suivant  $Ox$  et si l'on transpose au mouvement moléculaire thermique les résultats obtenus par EINSTEIN dans son étude du mouvement brownien, on obtient la relation :

$$X^2 = 2D \quad (9)$$

A partir de cette théorie il est facile de concevoir le transport de matière sans faire appel aux forces thermodynamiques.

Considérons une diffusion suivant l'axe  $Ox$  d'un cylindre,  $S$  une section droite de ce cylindre. Pendant l'unité de temps,  $\Delta n_1$  particules traversent la surface  $S$  par exemple de gauche à droite avec leur déplacement quadratique moyen  $X$  et  $\Delta n_2$  particules traversent  $S$  de droite à gauche avec le même déplacement quadratique moyen. Si le milieu est homogène  $\Delta n_1 = \Delta n_2$ , on n'observe aucun flux de substance, mais s'il y a un gradient de concentration  $\vec{G}$  tel que  $\Delta n_1 > \Delta n_2$ , pendant l'unité de temps, un excès de particules  $\Delta n$  traversera  $S$ ,  $\Delta n = \Delta n_1 - \Delta n_2$ . Cet excès mesure le flux  $J$  de substance diffusante à travers  $S$  et c'est lui qui est décelable par l'expérience.

MOREAU<sup>(4)</sup> a montré que la diffusion obéit à la deuxième loi de FICK si :



a) - les particules étudiées sont animées de mouvements aléatoires justiciables du calcul des probabilités.

b) - leurs conditions de déplacement sont statistiquement isotropes.

Ainsi, si le gradient de concentration est trop élevé l'activité des molécules varie d'un point à un autre, la condition d'isotropie n'est pas respectée, la loi de *FICK* ne s'applique pas.

Par contre, si le gradient de concentration est faible, rien ne s'oppose à ce que la concentration, elle, soit élevée.

La diffusion d'une espèce particulière obéira d'autant mieux à la loi de *FICK* qu'on sera proche de l'homogénéité chimique.

Ainsi, les considérations cinétiques mettent en évidence l'intérêt des milieux chimiquement homogènes pour l'étude des déplacements moléculaires thermiques.

Si la concentration est la même en tous les points, on n'observe plus de diffusion au sens primitif du terme, cependant l'équilibre statistique ainsi réalisé n'empêche pas les particules élémentaires de se mouvoir avec un déplacement quadratique satisfaisant à l'équation (9).

Mais les méthodes habituelles permettant de suivre une diffusion sous gradient de concentration ne sont plus applicables. Il est donc nécessaire de marquer les molécules par un isotope convenablement choisi : le gradient global de la concentration étant nul, on s'arrange pour établir un gradient  $\vec{G}^*$  de particules marquées. C'est le gradient qui satisfait aux équations (2) et (3) de *FICK*.

Puisque les conditions d'homogénéité sont respectées le coefficient  $D^*$  de diffusion des particules marquées est constant de sorte que l'équation (8) est applicable.

Selon les cas, la diffusion en milieu chimiquement homogène porte des noms différents.

a) - on appelle auto-diffusion, la diffusion d'un corps pur dans lui-même.

b) - si des particules A diffusent dans un milieu homogène, on parle de diffusion propre ou de self-diffusion. Le coefficient de self-diffusion  $D_A^*$  de A sera déduit, en utilisant une solution convenable, de



la deuxième loi de *FICK*.

On confond parfois sous le nom de self-diffusion, l'auto-diffusion et la diffusion propre.

Les méthodes les plus employées pour mesurer les coefficients de self-diffusion dans les solutions sont la méthode du diaphragme poreux et la méthode du tube capillaire.

La première demande des volumes importants de solution marquée et est inapplicable dans notre cas aussi nous ne la décrivons pas. Par contre nous allons exposer rapidement la technique que nous avons employée pour toutes nos mesures.

### III - METHODE DU TUBE CAPILLAIRE

Elle est particulièrement bien adaptée à la mesure des coefficients de self-diffusion. Au laboratoire, elle a été introduite et perfectionnée par *B. BRUN*<sup>(2)</sup> qui l'a utilisée avec beaucoup de succès pour élucider la structure de certaines solutions diluées d'électrolytes et étudier le comportement de mélanges binaires présentant ou non le caractère d'idéalité.

Elle a été employée à l'origine par *ANDERSON* et *SADDINGTON*<sup>(5)</sup> puis par *WANG*<sup>(6)</sup>.

#### - 1 - Principe

On emplit un tube capillaire de diamètre intérieur parfaitement constant et de longueur connue  $l$  à l'aide d'une solution d'un corps *A*, le diamètre intérieur est suffisamment grand pour que les phénomènes de capillarité n'interviennent pas.

Au temps  $t = 0$  de diffusion, la concentration est uniforme,  $C_0$ . On plonge le tube dans une grande masse de solvant pur, *A* diffuse. On retire, au bout du temps  $t$  de diffusion, le tube capillaire et on dose ce qui reste. On suppose que pendant toute la diffusion la concentration à l'orifice du tube est nulle.

On mesure la concentration  $\bar{C}$  moyenne et on calcule  $D$  moyen.





## - 2 - Cas de la self-diffusion

Pour la self-diffusion on mettra dans le tube capillaire une solution marquée A\* de concentration  $C_0$  et dans le ballon une solution de A à la même concentration  $C_0$ .

Nous sommes placés en milieu homogène donc nous appliquons la deuxième loi de FICK en supposant D constant. (équation 8).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (8)$$

On peut décrire la concentration c en soluté, en un point d'abscisse x, au temps t de diffusion par la série :

$$C = \frac{4C_0}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} (-1)^n \frac{4C_0}{\pi(2n+1)} \exp \left( -\frac{(2n+1)^2}{4 l^2} \pi^2 Dt \right) \cos \frac{(2n+1)\pi x}{2l} \quad (10)$$

En fait, on ne mesure pas la concentration en un point du capillaire, mais on analyse le contenu total de celui-ci. Il est donc préférable de calculer la concentration moyenne  $\bar{C}$  définie par l'équation suivante (11) :

$$\bar{C} = \frac{1}{l} \int_0^l C \, dl \quad (11)$$

$$\bar{C} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{C_0}{(2n+1)^2} \exp \left( -(2n+1)^2 \frac{\pi^2 Dt}{4 l^2} \right) \quad (12)$$

Pour des temps de diffusion suffisamment longs, tels que  $\frac{Dt}{l^2} > 0,2$ , on peut ne garder que le premier terme de la série et l'équation (12) se met sous la forme

$$D = \frac{4 l^2}{\pi^2 t} \operatorname{Log} \frac{8}{\pi^2} \frac{C_0}{\bar{C}} \quad (13)$$



--- CHAPITRE II ---



TECHNIQUES EXPERIMENTALES



I - DETERMINATION DU COEFFICIENT DE SELF-DIFFUSION

On marque un des constituants  $A^*$  de la solution étudiée, constituant dont on veut mesurer le coefficient de self-diffusion. Il peut aussi bien s'agir d'un ion que d'une molécule et même d'une macromolécule. On choisit convenablement l'isotope radioactif de telle sorte que sa période soit suffisamment longue pour que l'activité en fin de diffusion reste importante faute de quoi les mesures de radioactivité présentent une erreur non négligeable.

La solution marquée est introduite dans quatre capillaires de diamètre 1 mm et de longueurs légèrement différentes mais choisies pour que le temps de diffusion restant dans des limites acceptables, environ 200.000 secondes, on soit dans les conditions de validité de l'équation (12).

Ces quatre tubes capillaires sont immergés dans un volume important de solution non marquée; nous avons employé des ballons de 200cm<sup>3</sup> portant quatre tubulures latérales. Pour les solutions nécessitant une concentration importante en protéine nous avons employé des tubes de verre ayant 5 cm de diamètre et d'un volume de 40 cm<sup>3</sup>. Les quatre capillaires sont introduits dans 4 porte capillaires solidaires d'une tige de verre soudée elle-même au centre d'un bouchon rodé qui ferme hermétiquement les tubes. Les quatre capillaires sont donc introduits et retirés en même temps. Nous avons vérifié que le coefficient de self-diffusion de l'eau est le même en employant un volume de 200 cm<sup>3</sup> de solution non marquée et ce nouveau montage où le volume est réduit à 40 cm<sup>3</sup>. L'ensemble est placé dans une étuve thermostatée à la température désirée.



Au bout du temps  $t$  de diffusion qui non seulement satisfait à la condition  $\frac{Dt}{l^2} > 0,2$  mais aussi est tel que  $\frac{C}{C_0} < \frac{1}{2}$ , on retire les tubes et on mesure la radioactivité des solutions contenues dans chacun d'eux, soit  $R$ . Une fois les capillaires lavés avec beaucoup de soin, on les emplit de la solution initiale marquée et, de même, on mesurera la radioactivité des solutions de chacun d'eux soit  $R_0$ .

Il est évident que  $\frac{R_0}{R} = \frac{C_0}{C}$ , connaissant  $t$  et ayant mesuré la longueur  $l$  au comparateur, on peut facilement calculer  $D^*$ , coefficient de self-diffusion du composé  $A^*$  que l'on confond avec  $D$  coefficient de self-diffusion du composé  $A$ .

### 1 - Précision de la méthode .....

Influant sur la précision des mesures, il y a d'une part les erreurs dues à la manipulation même des tubes capillaires, d'autre part la précision avec laquelle on obtient les termes figurant dans le calcul de  $D$ .

De nombreuses études critiques ont été faites sur le premier point<sup>(7)(8)</sup>.

- La première source d'erreur provient du fait que l'introduction du tube capillaire dans la solution entraîne une diminution de l'activité dans le tube qui dans les cas les plus défavorables peut aller jusqu'à 2 %. C'est "l'erreur d'immersion"<sup>(9)(10)(11)</sup>.

Cependant, il est facile d'éliminer cet effet, il suffit de réaliser à la surface du tube capillaire un léger ménisque de liquide. De toute façon, connaissant  $R_0$  pour chaque tube capillaire et leur longueur  $l$ , on vérifie pour chaque mesure que  $R_0/l$  est une constante.

- Une des conditions aux limites permettant d'aboutir à l'équation (10) est que, à chaque instant, la concentration en élément marqué à la sortie du tube capillaire est nulle : quelque soit  $t$  pour  $x = l$ ,  $C = 0$ . On avait donc pensé qu'il fallait maintenir une agitation constante au-dessus de l'ouverture du capillaire et divers auteurs ont cherché les erreurs entraînées par cette agitation, c'est "l'effet  $\Delta l$ " ainsi nommé par WANG<sup>(12)</sup>. Celui-ci a montré qu'en agitant convenablement la solution on pouvait négliger cette erreur. Mais cette étude a été faite en





1952 et les mesures de radioactivité sont actuellement beaucoup plus précises, les autres causes d'erreurs étant moins importantes, cet effet ne paraît plus si négligeable ainsi que l'ont expliqué *LENGVEL et COLL.*<sup>(13)</sup>

Au contraire, ils montrent dans cet article que l'élimination de l'agitation n'apporte pas d'erreurs supplémentaires et donne une meilleure reproductibilité des résultats. Nous avons utilisé la méthode sans agitation pour la plupart de nos mesures, chacune est répétée quatre fois.

## 2 - *Mesure de la radioactivité* .....

La radioactivité des échantillons est mesurée par la méthode de la scintillation. Dans le cas d'isotopes émetteurs de rayons  $\gamma$ , le capillaire est compté directement sans autre manipulation, le scintillateur étant un cristal creux d'iodure de sodium. Pour les éléments radioactifs émettant un rayonnement  $\beta$ , le scintillateur est une substance fluorescente diluée dans du toluène; comme l'on est en solution aqueuse dans la plupart des cas, le mélange est homogénéisé grâce à de l'alcool absolu. Chaque échantillon est compté plusieurs fois car le nombre de désintégrations ainsi déterminé est soumis aux fluctuations statistiques. Dans les deux méthodes  $R$  et  $R_0$  sont connus à 0,5 % près. Les appareils utilisés sont le Packard Tri-carb liquid Scintillation Spectrometer et le compteur  $\gamma$  d'Electronique Appliquée.

Ainsi que nous l'avons souligné, les tubes capillaires employés sont calibrés, leur longueur est déterminée au comparateur à 0,05 mm près.

L'erreur sur le temps est tout à fait négligeable. On a environ une précision de 2 % sur la détermination du coefficient de self-diffusion  $D$  dans les cas les plus défavorables.

## II - DETERMINATION DE LA MASSE VOLUMIQUE ET DE LA VISCOSITE

La masse volumique a été mesurée par pycnométrie (pycnomètres de type *JAULHES*) et la viscosité à l'aide de viscosimètres de type *UBBELHODE* choisis correctement quant à leur constante  $k$  suivant la solution étudiée.

On applique la relation classique :

$$\eta = k \rho t \quad (14)$$



$\eta$  viscosité en centipoise  
 $k$  constante du viscosimètre en cSt/sec.  
 $\rho$  masse volumique en g/cm<sup>3</sup>  
 $t$  temps d'écoulement en s.

La précision est excellente sur  $\rho$  (0,002 %), sur  $\eta$  elle est un peu moins bonne.

### III - PRODUITS UTILISES

Les sels étudiés, chlorure de calcium, chlorure de zinc et chlorure de cuivre sont des produits purs pour analyses. On a déterminé le titre des solutions mères par dosage de l'ion chlore.

Les tampons sont préparés à partir de sels purs pour analyses ou fournis directement dans le cas du tampon véronal par L.K.B..

L'imidazole et l'histidine ont été utilisés directement sans autre purification.

La Serum Albumine Humaine utilisée est un produit FLUKA cristallisée suivant la technique décrite par COHN et Coll.<sup>(14)</sup>.

La cristallisation de la protéine est faite à partir de mélanges alcool-eau, COHN a montré que les albumines (albumine de boeuf ou humaine) ainsi préparées sont homogènes et non altérées.

Le produit a donc été employé sans autre purification. Chaque série d'expériences a été faite à partir du même lot de Serum Albumine Humaine.

#### *Produits marqués* .....

Nous avons utilisé divers isotopes radioactifs soit émetteurs  $\beta$  soit émetteurs  $\gamma$ .

|                   |                  |                     |                   |
|-------------------|------------------|---------------------|-------------------|
| émetteurs $\beta$ | Ca <sup>45</sup> | période 165 jours   | énergie 0,25 Mev  |
|                   | H <sup>3</sup>   | période 12,26 ans   | énergie 0,018 Mev |
|                   | C <sup>14</sup>  | période 5.600 ans   | énergie 0,158 Mev |
|                   | Cu <sup>64</sup> | période 12,8 heures | énergie 0,57 Mev  |



Le chlorure de calcium est marqué par  $\text{Ca}^{45}$ , l'imidazole est tritiée en ayant soin d'éliminer le tritium facilement échangeable c'est-à-dire celui lié à l'atome d'azote, l'histidine est marquée par l'isotope  $\text{C}^{14}$ . Ces isotopes ont été fournis par le C.E.A. Le chlorure de cuivre est marqué par l'isotope  $\text{Cu}^{64}$ .

|                    |                  |         |            |         |           |
|--------------------|------------------|---------|------------|---------|-----------|
| émetteurs $\gamma$ | $\text{I}^{131}$ | période | 8,05 jours | énergie | 0,364 Mev |
|                    | $\text{Zn}^{65}$ | période | 245 jours  | énergie | 1,11 Mev  |

La Serum Albumine Humaine, livrée par le C.E.A. est marquée à l'iode 131, le chlorure de zinc a été fourni par New England Nuclear, l'activité spécifique des échantillons étant supérieure à celle livrée par le C.E.A., il est marqué par l'isotope  $\text{Zn}^{65}$ .

Toutes les solutions ont été soigneusement dégazées, surtout celles que l'on a portées à 37°C.





-- CHAPITRE III --



METHODES UTILISEES POUR L'ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES PROTEINES  
ET LES METAUX.

-----

De nombreuses méthodes ont été employées pour étudier l'interaction entre les protéines et des ions ou des molécules. Elles essaient, non seulement d'obtenir le nombre d'ions ou de molécules liés par molécule de protéine, mais également, de distinguer le lieu de fixation et enfin, lorsque cela est possible, de permettre le calcul des constantes d'association.

Nous citons simplement les diverses méthodes employées couramment par les chercheurs qui se sont intéressés à ce problème en ne donnant en référence que les auteurs qui se sont appliqués à élucider les interactions entre la Serum Albumine Humaine et les métaux divalents. Il existe, en effet de nombreuses revues générales, sur ce sujet (16 à 21).

Retenons la classification particulièrement claire donnée par KLOTZ, il divise les méthodes d'investigation en deux catégories. Elles sont basées soit sur les changements qui interviennent dans les propriétés de la substance réagissant avec la molécule de protéine, soit sur les changements dans le comportement même de la molécule de protéine.

1 - METHODES BASEES SUR LES CHANGEMENTS INTERVENANT DANS LES PROPRIETES  
DE LA SUBSTANCE REACISSANT AVEC LA PROTEINE

Dans la première de ces catégories nous pouvons énumérer les méthodes suivantes :



## 1 - Solubilité .....

Cette méthode a été appliquée par WEIR et HASTING<sup>(22)</sup> pour mesurer le nombre d'ions calcium liés par molécule de diverses protéines : caséine, globuline, albumine.

## 2 - Dialyse d'équilibre .....

C'est une des méthodes les plus employées, aussi nous la décrirons rapidement.

La phase contenant la protéine et celle contenant l'ion ou la molécule à complexer sont placées dans des compartiments différents, séparés par une membrane imperméable aux macromolécules mais perméable à la petite molécule. S'il y a complexation, une fois l'équilibre atteint, la concentration en ion ou petite molécule sera plus grande dans le compartiment contenant la protéine que dans celui où il n'y a que la petite molécule. La différence entre ces deux concentrations donne la concentration en molécule liée.

Deux sources d'erreurs limitent cette méthode :

a) dans le cas de composés ioniques, on peut avoir une certaine asymétrie dans la distribution de la petite molécule due à l'effet DONNAN.

b) on peut toujours craindre de possibles absorptions de la petite molécule sur la membrane elle-même.

Cependant URIEL<sup>(23)</sup> a montré qu'en opérant avec des concentrations faibles en protéine et dans des sacs à dialyse tels que le rapport des volumes solution de protéine/solution d'ion à complexer soit de l'ordre de 1/50, ces deux sources d'erreurs sont éliminées.

De nombreux auteurs ont appliqué cette méthode aux interactions entre la Serum Albumine Humaine et les ions métalliques.<sup>(24 à 29)</sup>

Le dosage de l'ion ou de la molécule a été amélioré par l'emploi des isotopes radioactifs<sup>(30 à 32)</sup>.



### 3 - Ultracentrifugation .....

HELD et FREEMAN<sup>(33)</sup> ont appliqué cette méthode à l'étude de la liaison des ions calcium avec l'albumine et les globulines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , en ayant soin d'opérer en présence d'électrolytes et à des pH proches du domaine physiologique.

La méthode a été décrite par CHANUTIN, LUDEWIG et MASKET<sup>(34)</sup> et appliquée par BREEN et FREEMAN<sup>(35)</sup> à la détermination du degré de liaison du calcium sur les protéines du plasma humain.

En appliquant une force ultracentrifuge de l'ordre de 170.000g on obtient des gradients de concentration à la fois de la protéine et de l'ion considérés. Le centrifugat est alors fractionné et on détermine pour chaque fraction la quantité de calcium et de protéine.

En portant sur un graphique le nombre total de moles de calcium par rapport à celui de protéine on obtient par extrapolation à une concentration nulle en protéine la quantité de calcium libre. Ainsi par différence avec la quantité de calcium totale connue on peut calculer celle qui est liée à la protéine. Dans certaines expériences la force centrifuge a été appliquée jusqu'à ce qu'on obtienne un surnageant libre en protéine; ainsi le degré de fixation a pu être calculé une fois déterminée la concentration en calcium de cette couche.

### 4 - Coefficient de partage .....

Cette méthode permet d'éliminer l'effet DONNAN puisqu'elle est basée sur l'équilibre entre une phase organique et une phase aqueuse d'un soluté, la phase aqueuse contenant ou non la protéine.

Nous n'avons pas trouvé d'exemples d'application de cette méthode aux cas particuliers des interactions entre la Serum Albumine Humaine et les cations métalliques autres que ceux cités par KLOTZ<sup>(18)</sup>.





## 5 - Mesure de la force électromotrice d'une cellule convenablement choisie

Dans les études des interactions entre les protéines et les ions, ici spécialement certains anions, on peut trouver une électrode qui conduit à une réaction irréversible avec l'ion. Dans ce cas, la mesure de la f.e.m. d'une cellule convenablement choisie permet de calculer la concentration en ions libres en présence de protéine. Bien que cette méthode n'ait pas été appliquée aux interactions avec les cations  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Zn}^{++}$ , nous la signalons car c'est la plus employée pour l'étude quantitative des propriétés acido-basiques des protéines et les interactions entre les anions et Serum Albumine Humaine<sup>(36-37-38)</sup>.

## 6 - Mesures polarographiques

TANFORD<sup>(39)</sup> a montré que la mesure des courants limites  $i_L$  et  $(i_L)_0$  avec et sans protéine permet de calculer  $\bar{v}$ , le nombre d'ions métalliques, liés par molécule de protéine.

$$\frac{i_L}{(i_L)_0} = 1 - \frac{(1 - \alpha) \bar{v} C_p}{M_0} \quad (15)$$

où  $M_0$  est la concentration molaire totale de l'ion,  $C_p$  la concentration en protéine,  $\alpha$  une petite fraction qui caractérise la réduction du complexe métal-protéine à l'électrode particulière utilisée<sup>(28-39-40-41-42)</sup>.

## 7 - Mesures de conductivité

Cette méthode étant très sensible à la présence de petites quantités d'impuretés qui accompagnent la protéine, elle a été peu employée jusqu'à présent. Pourtant il est évident qu'un ion lié à une molécule de protéine subira un grand changement dans sa mobilité électrique. Van OS et KOOPMAN<sup>(43)</sup> ont ainsi étudié l'interaction de métaux alcalins et alcalino-terreux avec la Serum Albumine Humaine et montré que le sodium ne se liait pas à cette protéine.



## 8 - Diffusion

A notre connaissance, cette méthode n'a été employée que qualitativement par BENHOLD et Coll.<sup>(44)</sup> ainsi que le rapporte KLOTZ<sup>(18)</sup> dans le cas très particulier de la diffusion dans un tube de gélatine 5 % en matière sèche. On prépare, d'une part, un tube de gélatine 5 % et on fait diffuser dans cette gélatine un colorant, d'autre part, on fait diffuser dans un autre tube identique le colorant en présence d'une solution aqueuse de protéine. Avec l'albumine, le solvant diffuse beaucoup plus lentement dans le gel, en fait, BENHOLD suppose qu'il diffuse avec la vitesse de l'albumine.

Nous avons essayé d'employer quantitativement la méthode de diffusion dans les gels d'agar-agar<sup>(45)</sup>.

Nous avons étudié l'autodiffusion de l'eau dans des gels dont la concentration en matière sèche variait de 0,8 à 1,5 %. Le gel est préparé avec de l'eau tritiée et mis en contact avec un grand volume d'eau non marquée soumise à une agitation lente. Dans ces conditions, on peut définir le coefficient de self-diffusion de l'eau à partir de la deuxième équation de FICK dont les solutions sont dans ce cas précis :

$$C = C_0 \operatorname{erf} u \quad (16)$$

$$\text{avec } u = \frac{x}{2 \sqrt{Dt}} \quad (17)$$

$C_0$  est la concentration initiale en eau tritiée dans le gel

$C$  est la concentration en un point  $x$  du tube au temps  $t$

$\operatorname{erf} u$  est l'intégrale d'erreur.

Nous avons pu montrer que la diffusion de l'eau dans le gel se fait par le même mécanisme que dans l'eau pure; l'énergie d'activation de diffusion correspond à la rupture de deux liaisons hydrogène en moyenne, les macromolécules d'agar-agar n'interviennent ici que pour encombrer le chemin et, par suite, augmenter le parcours des molécules d'eau.

Une étude détaillée des phénomènes de diffusion de l'eau dans



les gels macromoléculaires et les systèmes dispersés a été faite récemment (15).

La méthode que nous avons employée, la mesure des coefficients de self-diffusion des ions métalliques en présence et en absence de protéine est exposée et discutée au chapitre IV.

### 9 - *Application de la Résonance Magnétique Nucléaire* .....

Bien que cette méthode récente n'ait pas été employée pour l'étude des interactions entre la Serum Albumine Humaine et les ions métalliques, elle est si intéressante que nous en exposerons rapidement les résultats. JARDETSKY<sup>(46)</sup> a montré que les changements différentiels dans les vitesses de relaxation en R.M.N. de haute résolution à la fois des petites molécules et des macromolécules peuvent servir à identifier les portions de molécules directement impliquées dans la formation de complexes.

Ainsi, il a pu montrer que la portion aromatique de la molécule de pénicilline est d'abord impliquée dans le mécanisme de complexation entre la Serum Albumine Humaine et cette molécule.

Dans cette méthode, le temps de relaxation  $T_2$  pour les divers pics obtenus en R.M.N. est calculé à partir de la largeur de la bande spectrale :

$$1/T_2 = \pi(\Delta\nu) \quad (18)$$

où  $\Delta\nu$  est la largeur de bande à mi-hauteur.

Il est une autre méthode qui permet de mesurer directement les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  des molécules étudiées, méthode dite de "l'écho de spin" dont nous parlerons au paragraphe suivant.

L'intérêt de la spectroscopie R.M.N. de haute résolution est de distinguer le lieu de fixation du complexe et l'on comprend que JARDETSKY<sup>(48)</sup> ait fait des études fort importantes sur les interactions entre haptènes et anticorps.





On sait que les ions paramagnétiques diminuent le temps de relaxation spin-réseau,  $T_1$ , des protons de l'eau et cet effet a été appliqué par EISINGER et Coll.<sup>(49)</sup> à l'étude des interactions entre des macromolécules, ici l'A.D.N. et certains ions.

En effet, le changement de vitesse de relaxation des protons de l'eau dépend non seulement de la concentration ionique mais également de l'environnement de l'ion. Si l'ion est lié à une macromolécule, telle l'A.D.N. il diminuera encore davantage le temps de relaxation des protons que lorsqu'il est en solution.  $T_1$  est mesuré par la méthode dite de "l'écho de spin".

EISINGER, après quelques hypothèses simplificatrices a défini un "facteur d'augmentation"  $\epsilon$  qui décrit les variations de  $T_1$ .

$$\epsilon = \frac{1/T_1^* - 1/T_{1(o)}^*}{1/T_1 - 1/T_{1(o)}} \sim \frac{T_1}{T_1^*} \sim \frac{p^* \tau_c^*}{p \tau_c} \quad (19)$$

où  $1/T_{1(o)}$  et  $1/T_{1(o)}^*$  sont les vitesses de relaxation des protons de l'eau dans la solution étudiée sans qu'on ait ajouté des ions paramagnétiques. L'astérisque correspond aux solutions contenant l'agent complexant, c'est-à-dire la macromolécule.

$1/T_1$  et  $1/T_1^*$  sont les vitesses de relaxation en présence d'ions paramagnétiques.

$p$  le nombre de protons dans la sphère d'hydratation.

$\tau_c$  le temps de corrélation.

Cette méthode a été employée par COHN<sup>(50 à 53)</sup> et ses collaborateurs pour étudier les complexes métal-enzyme-substrat.

#### 10 - Détermination du pH par spectrophotométrie des indicateurs métalliques

ETTORI et SCOGGAN<sup>(54-55)</sup> ont mis au point une méthode originale pour déterminer la quantité d'ions métalliques présents dans un milieu réactionnel contenant des macromolécules. L'interaction entre



les ions calcium et l'albumine de boeuf a été déterminée en prenant comme intermédiaire la murexide.

La méthode est basée sur l'additivité des densités optiques des deux formes sous lesquelles se trouve l'indicateur métallique, c'est-à-dire la murexide libre et la murexide liée au calcium. En présence de protéine il sera donc possible de déterminer la quantité de calcium libre donc, par différence, la quantité de calcium lié à la macromolécule.

L'avantage de la méthode utilisée est d'opérer en milieu chimiquement homogène, de tenir compte des interactions entre le milieu tampon utilisé par des déterminations préalables; mais, elle risque d'apporter certaines perturbations du fait de la présence de l'indicateur.

## II - METHODES BASEES SUR LES CHANGEMENTS DANS LE COMPORTEMENT MEME DE LA MOLECULE DE PROTEINE

### 1) - Potentiométrie

La fixation d'ions sur une molécule de protéine modifiera les pK de dissociation de ses groupements polaires. L'étude des courbes de titrage permet donc d'évaluer le nombre de liaisons formées<sup>(56-57)</sup>

### 2) - Spectrophotométrie

URIEL<sup>(23)</sup> a étudié les modifications spectrales de la Serum Albumine Humaine au cours de la formation de complexes solubles avec le cuivre. Parallèlement il a étudié le spectre d'absorption dans l'U.V. des complexes cuivriques d'une série d'acides aminés. Il a pu en conclure que les fixations multiples Cu-Sérum Albumine Humaine entre les pH 4,8 et 6,4 se font sur l'azote "pyridinique" des résidus histidine de la molécule protéique.

Les spectres d'absorption des métalloprotéines ont fait l'objet d'une revue récente<sup>(21)</sup>.



### 3 - Rotation optique et Dichroïsme circulaire .....

La dispersion optique rotatoire permet de donner à la fois des renseignements sur la structure de la protéine et la configuration des sites actifs. De nombreuses revues ont paru sur l'application de cette méthode aux métalloprotéines<sup>(21)</sup> mais nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'auteurs qui se soient intéressés au problème posé par les interactions entre la Serum Albumine Humaine et les cations métalliques.

### 4 - Changement dans le coefficient de sédimentation .....

HUGHES<sup>(58)</sup> a pu montrer que les sels mercuriques donnaient des gémères avec la Serum Albumine Humaine en mesurant le coefficient de sédimentation des solutions étudiées. Alors que S.A.H. possède un coefficient  $S_{20,w} = 4,6$  S, une grande quantité de produit avait une constante de sédimentation de 6,5S (70 % à pH 7,5).

### 5 - Variation de la mobilité électrophorétique .....

LAL et RAO<sup>(59-60)</sup> ont étudié la mobilité électrophorétique des complexes entre la Serum Albumine de Boeuf et les ions  $Cu^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Cd^{++}$  et  $Co^{++}$  en milieu tamponné de force ionique fixée.

Les mesures électrophorétiques poursuivent deux buts utiles. D'abord elles servent à la définition du terme électrostatique. D'autre part elles permettent de savoir jusqu'à quel point les interactions peuvent être compétitives ou non.

Cependant LAL et RAO sont obligés de faire appel à d'autres méthodes telles la polarographie pour expliciter leurs résultats.

Les mobilités de la Serum Albumine en milieu tamponné, mais contenant des concentrations croissantes en sels de zinc ou de cadmium ont été mesurées par WALDIAN-MEYER<sup>(61)</sup> en employant l'électrophorèse de zone.





Le changement de mobilité produit par l'association des ions métalliques peut être décrit par un rapport charge/mobilité obtenu en tenant compte des données électrophorétiques et d'autres données expérimentales telles que celles obtenues au moyen de la dialyse d'équilibre et du titrage par différents auteurs. Ils ont vérifié que ce rapport expérimental est en accord avec le rapport théorique calculé par l'équation de *DEBYE-HUCKEL-HENRY*.

Cette méthode leur permet d'atteindre les constantes intrinsèques de liaison entre les ions métalliques et l'albumine.



-- CHAPITRE IV --



METHODE DES COEFFICIENTS DE SELF-DIFFUSION

-----

L'aspect théorique de la méthode générale de mesure des coefficients de self-diffusion a été exposé en détails au chapitre I et nous allons ici insister sur la détermination des interactions protéine-ion métallique par cette méthode.

Un système métal-protéine, à l'équilibre et pour des conditions expérimentales données est habituellement défini par  $\bar{v}$ , le nombre d'ions métalliques liés par molécule de protéine. Il s'agit pour nous de relier la mesure des coefficients de self-diffusion des ions métalliques en présence et en absence de protéine dans des solutions convenablement choisies, au calcul de  $\bar{v}$ .

I - MESURE DE  $D_M$  ET  $D_M^m$  - APPLICATION A LA DETERMINATION DE  $\bar{v}$

Considérons un milieu réactionnel tamponné dont on connaît la force ionique et la concentration en ions métalliques bivalents  $M^{++}$ . Les ions métalliques  $M^{++}$  diffusent dans le milieu réactionnel et nous pouvons déterminer par la méthode, précédemment décrite, du tube capillaire, leur coefficient de self-diffusion, soit  $D_M$ .

Il est à noter que  $D_M$  peut être différent du coefficient de self-diffusion de l'ion  $M^{++}$  dans une solution aqueuse de même concentration s'il existe une interaction entre l'ion métallique considéré et les ions du tampon employé.

Cette méthode est d'ailleurs fort sensible pour déterminer s'il y a influence du milieu tampon sur l'ion  $M^{++}$ .



Considérons le même milieu avec la même concentration en ions métalliques et la même force ionique, mais contenant une quantité bien déterminée de protéine.

Dans ce milieu, nous mesurons le coefficient de self-diffusion de l'ion métallique, soit  $D_M^m$ .

$D_M^m$  est un coefficient de self-diffusion moyen ou apparent qui résulte de la diffusion de deux entités cinétiques : les ions métalliques libres qui diffusent avec le coefficient de self-diffusion  $D_M$  et les ions métalliques liés à la protéine qui diffusent avec le coefficient de self-diffusion de la protéine  $D_p$ .

Le déplacement quadratique moyen pendant l'unité de temps,  $X$ , est nous le savons, relié au coefficient de self-diffusion par la formule (9).

$$X^2 = 2D \quad (9)$$

Dans le cas tout à fait général, supposons que les atomes radioactifs soient transportés par 1, 2, ... i....n molécules différentes, soit N leur nombre total. Il y a  $n_1$  molécules d'espèce 1,  $n_i$  d'espèce i... etc ...

Supposons que, pendant l'unité de temps, la projection du déplacement de chaque molécule soit repérée sur un axe  $Ox$  choisi. Par définition même du déplacement quadratique moyen  $X$ ,

$$X^2 = \frac{\sum x_1^2}{N} + \frac{\sum x_2^2}{N} + \dots + \frac{\sum x_i^2}{N} + \dots + \frac{\sum x_n^2}{N}$$

$X^2$  est relié au coefficient de self-diffusion "moyen" par la relation

$$X^2 = 2D_m^*$$





donc

$$D_m^* = \frac{1}{2} \left( \frac{\sum x_1^2}{N} + \frac{\sum x_i^2}{N} + \dots + \frac{\sum x_n^2}{N} \right)$$

ou bien

$$D_m^* = \frac{1}{2} \left( \frac{\sum x_1^2}{n_1} \frac{n_1}{N} + \frac{\sum x_i^2}{n_i} \frac{n_i}{N} + \dots + \frac{\sum x_n^2}{n} \frac{n}{N} \right)$$

Posons

$$\begin{aligned} \frac{n_i}{N} &= c_i \\ D_m^* &= \frac{1}{2} \left( c_1 \frac{\sum x_1^2}{n_1} + \dots + c_i \frac{\sum x_i^2}{n_i} + \dots + c_n \frac{\sum x_n^2}{n} \right) \\ &= \frac{1}{2} \left( c_1 x_1^2 + \dots + c_i x_i^2 + \dots + c_n x_n^2 \right) \end{aligned}$$

Pour chaque espèce diffusante on applique la relation d'Einstein

$$D_m^* = c_1 D_1^* + \dots + c_i D_i^* + \dots + c_n D_n^*$$

$$\boxed{D_m^* = \sum c_i D_i^*} \quad (20)$$

Dans le cas particulier où les ions traceurs sont transportés soit par les molécules de protéine, soit sont à l'état libre, on peut donc en appliquant (20) écrire que



$$D_M^m = D_M \frac{(M^{2+})_{\text{libres}}}{(M^{2+})_{\text{totale}}} + D_P \frac{(M^{2+})_{\text{liés}}}{(M^{2+})_{\text{totale}}} \quad (21)$$

$$\bar{v} = \frac{(M^{2+})_{\text{liés}}}{(\text{Protéine})} \quad (22)$$

$$\text{comme } (M^{2+})_{\text{libres}} + (M^{2+})_{\text{liés}} = (M^{2+})_{\text{totale}} \quad (23)$$

on obtient

$$\bar{v} = \frac{D_M - D_M^m}{D_M - D_P} \times \frac{(M^{2+})_{\text{totale}}}{(\text{Protéine})} \quad (24)$$

L'équation (24) permet de calculer le nombre  $\bar{v}$  d'ions liés par molécule de protéine pour chaque concentration en ions métalliques de la solution.

Lorsqu'il existe dans le milieu un équilibre chimique tel que celui que nous étudions, l'élément marqué est transporté tantôt par la protéine, tantôt seul.

Mais, puisque l'équilibre thermostatique est conservé dans le milieu, la concentration en chacune des entités cinétiques considérées reste la même.

Il en résulte que la démonstration est toujours valable à condition que le processus élémentaire de diffusion soit court par rapport à la vie moyenne de chaque entité cinétique.

## II - LIMITES DE LA METHODE

### 1 - Calcul classique d'erreur

Nous supposons que les concentrations en ions métalliques et en protéine sont connues avec exactitude, l'erreur sur la valeur de  $\bar{v}$  ne provient que des erreurs commises sur les coefficients de self-diffusion. Nous avons établi que



$$\bar{v} = \frac{D_M - D_M^m}{D_M - D_P} \cdot \frac{(M^{++})_{\text{totale}}}{(\text{Protéine})} \quad (24)$$

Calculons algébriquement l'erreur relative  $\frac{\delta \bar{v}}{\bar{v}}$

$$\frac{\delta \bar{v}}{\bar{v}} = \frac{\delta (D_M - D_M^m)}{D_M - D_M^m} - \frac{\delta (D_M - D_P)}{D_M - D_P} \quad (25)$$

$$\frac{\delta \bar{v}}{\bar{v}} = \delta D_M \left( \frac{1}{D_M - D_M^m} - \frac{1}{D_M - D_P} \right) - \frac{\delta D_M^m}{D_M - D_M^m} + \frac{\delta D_P}{D_M - D_P} \quad (26)$$

Donc l'erreur relative  $\frac{\Delta \bar{v}}{\bar{v}}$  est

$$\frac{\Delta \bar{v}}{\bar{v}} = \Delta D_M \left( \frac{1}{D_M - D_M^m} - \frac{1}{D_M - D_P} \right) + \frac{\Delta D_M^m}{D_M - D_M^m} + \frac{\Delta D_P}{D_M - D_P} \quad (27)$$

## 2 - Discussion

$\Delta D_M$ ,  $\Delta D_M^m$  et  $\Delta D_P$  dépendent des conditions expérimentales et les erreurs absolues sur les coefficients de self-diffusion peuvent être évaluées pour  $\Delta D_M$  et  $\Delta D_M^m$  à  $10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  et  $\Delta D_P$  à  $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$  dans les cas les plus défavorables.

Par contre la formule (27) montre que l'erreur relative  $\frac{\Delta \bar{v}}{\bar{v}}$  sera d'autant plus faible que les différences  $(D_M - D_M^m)$  et  $(D_M - D_P)$  seront plus grandes.

Ces deux facteurs sont d'ailleurs liés; si le coefficient de self-diffusion de la protéine est faible par rapport à celui des ions métalliques (10 fois plus petit dans notre cas) d'une part  $D_M - D_P$  est important et de l'ordre de  $D_M$ , et d'autre part,  $D_M^m$  est petit. Par contre il est facile de comprendre que la concentration totale en ions métalliques intervient.



En effet, nous avons vu que  $D_M^m$  est un coefficient de self-diffusion moyen ou apparent de deux entités cinétiques, les ions métalliques liés à la protéine et les ions métalliques libres. Il est bien évident que si la concentration en ions métalliques libres croît dans le milieu réactionnel,  $D_M^m$  va tendre vers  $D_M$ , la différence  $D_M - D_M^m$  diminue et l'erreur sur le nombre d'ions métalliques liés augmente. En fait, il faudrait appliquer la méthode statistique pour calculer l'erreur  $\frac{\Delta \bar{V}}{\bar{V}}$ . Par exemple,  $D_M$  souvent ne varie pas dans le domaine de concentration étudié et on peut penser que la valeur de  $D_M$  résultant d'une vingtaine de mesures différentes est alors connue avec exactitude.

### 3 - Cas des systèmes histidine-ion zinc et imidazole-ion zinc

Nous avons appliqué aux systèmes histidine-ion zinc et imidazole-ion zinc la formule (20).

Considérons, par exemple, le système histidine-ion zinc. Dans le milieu réactionnel considéré nous pouvons mesurer séparément les coefficients de self-diffusion de l'histidine et des ions métalliques par la méthode du tube capillaire en marquant la solution soit par l'histidine marquée au carbone  $C^{14}$ , soit par l'isotope Zn 65.

Ainsi nous définissons un coefficient de self-diffusion moyen,  $D_H^m$ , des molécules d'histidine soit libres soit complexées avec l'ion zinc et un coefficient de self-diffusion moyen  $D_{Zn}^m$  des ions zinc soit libres, soit complexés.

Dans les solutions ne contenant que de l'histidine on peut mesurer  $D_H$  le coefficient de self-diffusion des molécules d'histidine libres et dans les solutions ne contenant que des ions zinc on mesure  $D_{Zn}$  coefficient de self-diffusion des ions zinc libres.

Si nous appelons  $D_c$  le coefficient de self-diffusion du complexe zinc-histidine, l'application de la formule (20) dans le cas où l'histidine est marquée conduit à :





$$D_H^m = c_c D_c + c_H D_H \quad (28)$$

$$\text{où } c_c = \frac{(\text{Histidine})_{\text{liée}}}{(\text{Histidine})_{\text{totale}}}$$

$$\text{et } c_H = \frac{(\text{Histidine})_{\text{libre}}}{(\text{Histidine})_{\text{totale}}}$$

$$\text{Donc } D_H^m (\text{Histidine})_{\text{totale}} = D_c (\text{Histidine})_{\text{liée}} + D_H (\text{Histidine})_{\text{libre}}$$

(formule 29)

Si l'atome marqué est le zinc, le même calcul conduit à la formule (30)

$$D_{Zn}^m (Zn^{++})_{\text{totale}} = D_c (Zn^{++})_{\text{lié}} + D_{Zn} (Zn^{++})_{\text{libre}} \quad (30)$$

La combinaison de (28) et (30) permet d'atteindre théoriquement le nombre de molécules d'histidine liées par un ion zinc.

$$\frac{(\text{Histidine})_{\text{liée}}}{(Zn^{++})_{\text{lié}}} = \frac{D_{Zn} - D_c}{D_H - D_c} \cdot \frac{D_H - D_H^m}{D_{Zn} - D_{Zn}^m} \cdot \frac{(\text{Histidine})_{\text{totale}}}{(Zn^{++})_{\text{totale}}} \quad (31)$$

Il y a une première difficulté pour appliquer l'équation (31). On ne connaît pas  $D_c$ , le coefficient de self-diffusion du complexe. Cependant il semble raisonnable de considérer que, dans le cas où la concentration totale en histidine est 10 fois plus grande que celle en ion métallique, tous les ions sont complexés et  $D_c = D_{Zn}^m$ .

L'équation (31) se simplifie alors et devient

$$\frac{(\text{Histidine})_{\text{liée}}}{(Zn^{++})_{\text{lié}}} = \frac{D_H - D_H^m}{D_{Zn} - D_{Zn}^m} \times 10 \quad (32)$$



Pour d'autres rapports de concentration (Histidine)<sup>totale</sup>/  
(Zn<sup>++</sup>)<sup>totale</sup>, où l'on ne peut plus faire l'approximation ci-dessus, on prend comme valeur de D<sub>c</sub> celle déterminée à partir de (32).

Cependant le calcul d'erreur montre que les formules (31) et (32) donnent plus une indication qualitative qu'une interprétation quantitative du phénomène observé.

En effet si  $\bar{v} = \frac{(\text{Histidine})_{\text{liée}}}{(\text{Zn}^{++})_{\text{lié}}}$ , dans le cas où D<sub>c</sub> = D<sub>Zn</sub><sup>m</sup>

on trouve que :

$$\frac{\Delta \bar{v}}{\bar{v}} = \frac{\Delta D_H^m}{D_H^m - D_H} + \frac{\Delta D_{Zn}^m}{D_{Zn}^m - D_H} + \Delta D_H \left( \frac{1}{D_{Zn}^m - D_H} - \frac{1}{D_H^m - D_H} \right) \quad (33)$$

et dans le cas de l'équation (31) :

$$\begin{aligned} \frac{\Delta \bar{v}}{\bar{v}} = & \Delta D_{Zn} \left( \frac{1}{D_{Zn} - D_{Zn}^m} - \frac{1}{D_{Zn} - D_c} \right) + \Delta D_c \left( \frac{1}{D_{Zn} - D_c} - \frac{1}{D_H - D_c} \right) \\ & + \Delta D_H \left( \frac{1}{D_H - D_H^m} - \frac{1}{D_H - D_c} \right) + \frac{\Delta D_H^m}{D_H - D_H^m} + \frac{\Delta D_{Zn}^m}{D_{Zn} - D_{Zn}^m} \end{aligned} \quad (34)$$

Dans les deux cas envisagés l'erreur relative sur la valeur de  $\bar{v}$  est d'à peu près 35 %, aussi tout ce que l'on peut déduire de la mesure des coefficients de self-diffusion des espèces en présence est la formation ou l'absence de complexe; il serait aventureux de donner une valeur précise à  $\bar{v}$ .

Cependant si D<sub>Zn</sub><sup>m</sup> < D<sub>Zn</sub> et D<sub>H</sub><sup>m</sup> < D<sub>H</sub>, de tels abaisséments des coefficients de self-diffusion sont explicables par la formation de complexes entre les espèces diffusantes considérées, la mesure des coefficients de self-diffusion permet donc une interprétation qualitative du phénomène.

La précision, nous le verrons pour chaque cas particulier, est bien meilleure quand il y a complexation entre les ions métalliques et les macromolécules.



--- CHAPITRE V ---



LA SERUM ALBUMINE HUMAINE

La Serum Albumine Humaine est la protéine la plus abondante dans un système protéique facilement disponible, aussi, de nombreux travaux ont-ils été entrepris par les physico-chimistes sur cette macromolécule. Peut-être est-il dommage, ainsi que le souligne FOSTER<sup>(62)</sup>, que l'on ait fait tant d'études sur une protéine qui ne possède pas de propriétés biologiques bien établies : ni activité enzymatique, ni activité hormonale.

VRIEL<sup>(23)</sup> a étudié qualitativement l'activité précipitante de quelques métaux sur les protéines sériques séparées par électrophorèse en gélose. Il a ainsi montré que la Serum Albumine Humaine était la fraction sérique ayant le seuil de précipitation individuel le plus haut. Le seuil de précipitation est la concentration minimale en ions métalliques nécessaire pour insolubiliser totalement un composé protéique donné.

D'autre part, vis à vis des protéines sériques, le pouvoir global de précipitation suit la série décroissante.



Nous avons donc choisi d'étudier les systèmes Serum Albumine Humaine- $\text{Zn}^{++}$ , Serum Albumine Humaine- $\text{Ca}^{++}$  et Serum Albumine Humaine- $\text{Cu}^{++}$ . Il est intéressant d'appliquer la méthode des coefficients de self-diffusion au système Serum Albumine Humaine- $\text{Cu}^{++}$  car il est connu quantitativement par de nombreuses autres méthodes mais nous avons eu certaines difficultés exposées ultérieurement à cause de la faible valeur de la période de l'isotope  $\text{Cu}^{64}$  utilisé dans nos mesures.

Bien que de nombreux mémoires<sup>(62-63-19-64-16-65)</sup> soient parus à ce sujet, rappelons les propriétés chimiques et physiques de la Serum Albumine Humaine.





## I - ETUDE CHIMIQUE DE LA SERUM ALBUMINE HUMAINE

### 1 - Généralités .....

La Serum Albumine Humaine a un poids moléculaire évalué à 69.000; sa composition en aminoacides a été déterminée mais on ne connaît même pas sa structure primaire. Actuellement, des études se poursuivent dans ce sens<sup>(66)</sup>.

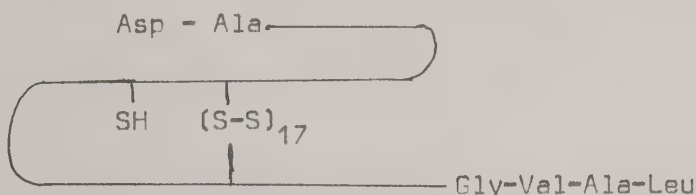
Dans la colonne A, on a porté les grammes d'acides aminés pour 100g de protéine, dans la colonne B le nombre de moles d'acides aminés pour 100.000g de protéine et dans la colonne C le nombre d'acides aminés pour une mole de protéine.

La composition de la Serum Albumine Humaine n'est pas remarquable sauf par la présence d'un seul résidu tryptophane (il y en a 2, dans la Serum Albumine de Boeuf). Il y a un seul résidu cystéine qui fournit un groupement sulfhydryle libre, groupement jouant un rôle important dans la réactivité et l'aggrégation de Serum Albumine Humaine<sup>(67-68)</sup>.

En fait, l'albumine de boeuf ou l'albumine humaine, préparées par fractionnement dans l'éthanol ou par précipitation par le sulfate d'ammonium contient moins d'un groupe thiol par molécule<sup>(21-58)</sup>. On peut montrer qu'il y a 0,65 à 0,70 groupement thiol par molécule d'Albumine Humaine. Cependant, les préparations d'albumine sont parfaitement homogènes par ultracentrifugation ou électrophorèse.

Ainsi que nous l'avons souligné, on ne connaît pas la structure primaire de l'albumine à cause de la très grande taille de cette protéine, mais, on a fait de nombreuses études concernant la détermination des groupements finaux, amino et carboxyle des séquences terminales correspondantes.

On pense généralement que l'albumine est formée d'une seule chaîne polypeptidique, stabilisée par des ponts disulfures, on peut représenter schématiquement la molécule d'albumine par le diagramme suivant :





Le tableau I donne la composition en aminoacides

--- TABLEAU I ---

| Aminoacide       | A             | B    | C  |
|------------------|---------------|------|----|
| Glycine          | 1,60          | 21,3 | 15 |
| Alanine          | non détermine |      |    |
| Sérine           | 3,70          | 35,2 | 22 |
| Thréonine        | 5,0           | 42,0 | 27 |
| Proline          | 5,1           | 44,3 | 31 |
| Hydroxyproline   | 0             | 0    | 0  |
| Valine           | 7,7           | 65,8 | 45 |
| Isoleucine       | 1,7           | 13,0 | 9  |
| Leucine          | 11,9          | 90,8 | 58 |
| Phénylalanine    | 7,8           | 47,3 | 33 |
| Tyrosine         | 4,66          | 25,7 | 18 |
| Tryptophane      | 0,19          | 0,9  | 1  |
| Cystine/2        | 5,58          | 46,5 | 32 |
| Cystéine         | 0,7           | 5,8  | 4  |
| Méthionine       | 1,28          | 8,6  | 6  |
| Acide Aspartique | 10,4          | 78,2 | 48 |
| Acide Glutamique | 17,4          | 11,8 | 80 |
| Amide N          | 0,88          | 62,9 | 44 |
| Arginine         | 6,15          | 35,3 | 25 |
| Histidine        | 3,50          | 22,6 | 16 |
| Lysine           | 12,30         | 84,2 | 58 |
| Hydroxyllysine   | 0             | 0    | 0  |



Il y a 17 ponts disulfure dans la molécule d'albumine mais l'organisation de la molécule n'est pas connue. La méthode de KAUZMAN<sup>(67)</sup> permet de comparer la probabilité relative des différents isomères. KOLTHOFF a montré que la structure de l'albumine à l'état natif correspond vraisemblablement à l'un des isomères les plus probables.

Cependant, si la présence des ponts disulfures dans une molécule protéique apporte une contribution supplémentaire et non négligeable à la stabilité thermodynamique de l'ensemble, et détermine pour une part la conformation de la molécule, il semble un peu artificiel de considérer seulement cet élément.

L'ensemble des interactions entre les chaînes latérales, les liaisons hydrophobes, interviennent dans la structure des protéines globulaires en solution.

## 2 - Caractère Amphotère .....

Parmi les propriétés des protéines, l'une des plus caractéristiques et offrant énormément d'intérêt est leur caractère amphotère.

A partir des courbes de titrage de l'albumine, TANFORD<sup>(19-36-68)</sup> a pu analyser les divers groupements existant dans la molécule de protéine (Tableaux II et III).

On voit que l'accord entre l'analyse des aminoacides et les courbes de titrage est bon sauf pour les groupements carboxyle dans le cas de l'albumine de boeuf.

On peut cependant remarquer quelques anomalies :

- La constante d'ionisation de ces groupements carboxyle est faible comparée à celle trouvée pour ces mêmes groupes dans d'autres protéines (Tableau III).

- Les groupes  $\epsilon$ -amino ont un  $pK_{int}$  bas et celui des groupes phénoliques est relativement élevé.

Divers auteurs ont attribué ces modifications à la formation de liaisons hydrogène entre les résidus phénoliques qui jouent le rôle de



--- TABLEAU II ---

| Groupement                    | Nombre de moles d'acides aminés par molécule de protéine |         |                    |         |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------|---------|--------------------|---------|
|                               | trouvé pour E.S.A.                                       | Analyse | trouvé pour H.S.A. | Analyse |
| $\alpha$ -carboxyle           | 1                                                        | 1       |                    |         |
| $\beta$ - $\gamma$ -carboxyle | 99                                                       | > 89,9  | 106                | 106     |
| Imidazole                     | 16                                                       | 16,8    | 16                 | 16      |
| $\alpha$ -amino               | 1                                                        | 1       | 1                  | 1       |
| $\epsilon$ -amino             | 57                                                       | 57      |                    |         |
| Phénolique                    | 19                                                       | 18,1    | 18                 | 18      |
| Guanidine                     | 22                                                       | 22,0    | 24                 | 24      |
| Sulfhydryle                   | 0                                                        | 0,7     | 1                  | -       |

--- TABLEAU III ---

| Groupement                                             | $pK_{int}$ observé |                   | autres protéines |
|--------------------------------------------------------|--------------------|-------------------|------------------|
|                                                        | H.S.A.             | B.S.A.            |                  |
| $\alpha$ -Carboxyle }<br>$\beta$ - $\gamma$ -Carboxyle | 4,00               | 3,75<br>3,92-4,02 | 3,6<br>4,3-4,7   |
| Imidazole                                              | 6,10               | 6,9               | 6,4-7,0          |
| $\alpha$ -Amino                                        | 8,00               | 7,75              | 7,45-7,9         |
| $\epsilon$ -Amino                                      | 9,40               | 9,8               | 10,1-10,6        |
| Phénolique                                             | 9,60               | 10,35             | 9,5-10,9         |
| Guanidine                                              | -                  | > 12              | 11,9-13,3        |





"donneur" et les groupements carboxyle qui joueraient le rôle "d'accepteur" (69).

Cependant TANFORD (19) pense qu'il n'y a pas que cette liaison entre les groupes tyrosine-carboxyle. En effet, il y a d'abord disproportion dans l'importance numérique de ces groupements, 19 groupes tyrosine pour 99 groupes carboxyle donc, une liaison entre ces groupes entraînerait la scission en deux classes distinctes des groupes carboxyle, cette scission se manifestant par une différence de leurs pK.

Quant aux autres groupements qui, éventuellement, pourraient être "donneurs", TANFORD a montré qu'on ne peut raisonnablement envisager de liaison hydrogène entre les groupes ε amino (leur  $pK_{int}$  aurait une valeur supérieure à celle observée), ou, les groupes hydroxyle aliphatiques (les liaisons hydrogène ne seraient pas de même force que celles entre la tyrosine et le carboxyle) et les groupes carboxyle.

Les explications proposées par TANFORD ne rendent pas compte des anomalies observées et il faudrait mieux connaître la nature des liaisons internes dans la molécule d'albumine pour pouvoir conclure.

Les différences observées dans les courbes de titrage des Albumines Humaine et Bovine ne sont pas significatives, elles sont, sans doute, dues au fait que les études ont été faites à plusieurs années d'intervalle et que les méthodes se sont affinées. On peut ainsi considérer que les pK des divers groupes de S.A.H. sont les mêmes que ceux de S.A.B.

Les valeurs des  $pK_{int}$  données dans le tableau III ne tiennent pas compte du facteur électrostatique, il est bien évident qu'elles seront modifiées suivant la charge portée par la protéine. Comme la courbe de titrage est très complexe, on a supposé qu'il y a peu de classes de groupes ionisables et qu'à l'intérieur d'une même classe les groupes sont identiques.

L'énergie libre standard d'ionisation d'un groupe à l'intérieur d'une classe a deux parties, un terme intrinsèque et un terme provenant d'interactions électrostatiques.

$$\Delta F^{\circ} = \Delta F_{int}^{\circ} + \Delta F_{elec}^{\circ} \quad (35)$$



Le terme électrostatique peut dépendre de la localisation de chaque groupe chargé sur la molécule de protéine.

Puisqu'on ne connaît pas cette distribution, on suppose que le terme électrostatique est proportionnel à la charge Z portée par la protéine.

$$\Delta F^{\circ} = \Delta F_{int}^{\circ} - R T W Z \quad (36)$$

Si r ions  $H^{+}$  sont combinés avec n groupes de la classe considérée, il reste (n-r) sites "basiques" dans cette classe.

$$\text{Donc } pH - \log \frac{n-r}{r} = pK' = pK_{int} - 0,868 WZ \quad (37)$$

W est le facteur d'interaction électrostatique donné par la théorie de DEBYE-HUCKEL pour un ion sphérique de rayon b et de rayon d'exclusion a, la charge est supposée distribuée d'une façon homogène sur toute la surface de l'ion.

$$W = \frac{\epsilon^2}{2DkT} \left( \frac{1}{b} - \frac{K}{1 + Ka} \right) \quad (38)$$

$\epsilon$  charge de l'électron

D constante diélectrique du solvant

T température absolue

K paramètre de DEBYE-HUCKEL proportionnel à la racine carrée de la force ionique du milieu.

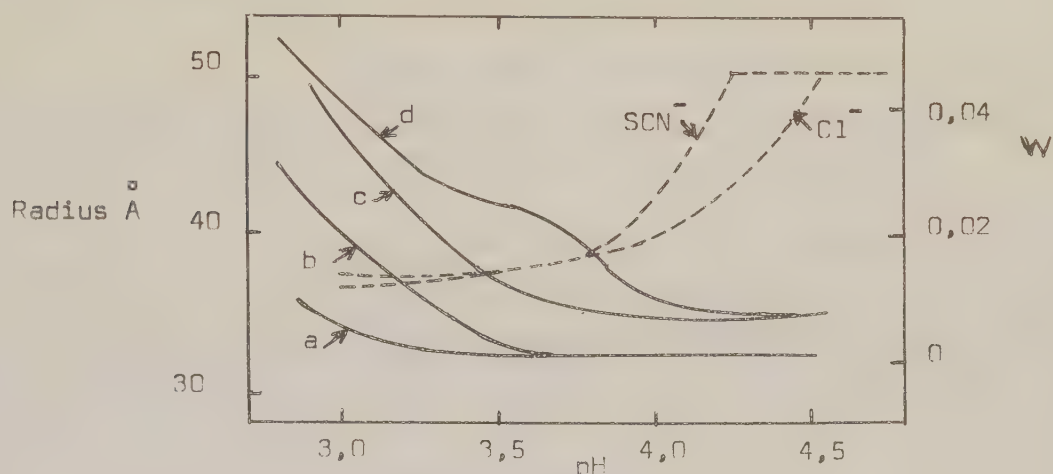
Cette théorie simplifiée a été satisfaisante pour interpréter les courbes de titrage de nombreuses protéines malgré les hypothèses simplificatrices qu'elle implique<sup>(70-71-72)</sup>.

### 3 - Comportement aux pH acides ou basiques

Pour une force ionique donnée, W n'est pas constant sur tout le domaine de pH. Quand on se place à un pH inférieur au pH isoélectrique, il y a diminution de W. Cette diminution de W a été interprétée par TANFORD comme résultant d'une expansion de la molécule d'albumine. Cependant la



figure 2, tirée du mémoire de FOSTER<sup>(62)</sup> montre que la dilatation de la molécule intervient dans une zone de pH où la décroissance de W est terminée. Donc la dilatation ne donne pas une explication totale du caractère anormal du comportement aux pH bas de l'albumine.



(figure 2)

Variations des valeurs apparentes du paramètre W et du rayon moléculaire en fonction du pH.

Les courbes en traits pointillés correspondent à W, les courbes en traits pleins correspondent aux rayons mesurés de différentes façons et dans les diverses conditions. La courbe a pour 0,02  $\text{SCN}^-$  et la courbe b pour 0,02  $\text{Cl}^-$  sont calculées à partir de mesures de mobilités électrophorétiques. La courbe c pour 0,02  $\text{SCN}^-$  et la courbe d pour 0,02  $\text{Cl}^-$  sont calculées à partir de mesures de sédimentation.

La plupart des études concernant les changements structuraux de l'albumine aux pH acides inférieurs au pH isoélectrique ont été faites sur l'albumine de boeuf. On a pu mettre en évidence deux formes appelées la "forme N" ou normale existant aux pH supérieurs à 4,5 et la "forme F" appelée ainsi car sa mobilité est plus grande. Ces deux formes sont en équilibre :  $\text{N}^- + 3\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{F}$ . La force ionique du milieu et la température peuvent agir sur cet équilibre.

Le comportement électrophorétique de l'albumine aux pH acides a fait l'objet de nombreux travaux<sup>(73-74)</sup>.





FOSTER<sup>(62)</sup> a résumé les données établies pour l'albumine de boeuf mais nous n'avons pas trouvé dans la littérature des renseignements complémentaires concernant la Serum Albumine Humaine.

De toutes façons, nous avons opéré à des pH > 4,5 où cette transition n'intervient pas.

En milieu alcalin, de même nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'études systématiques sur la structure de l'albumine. Nous avons utilisé le milieu tampon véronal dont le pH est 8,6.

Ce milieu est utilisé par les immunochimistes et ils considèrent que l'albumine ne subit aucune transformation dans ce milieu. Ceci est vérifié par toutes les expériences de précipitation spécifique entre la Serum Albumine Humaine et les immunosérums anti-S.A.H.

#### 4 - *Liaison avec les ions* .....

Outre les protons, la Serum Albumine se lie d'une façon non spécifique aussi bien avec les anions qu'avec les cations. Peu de protéines montrent une telle affinité envers les anions.

##### a) - *Liaison avec les anions* .....

Tous les anions semblent se lier à la Serum Albumine et, si fortement, que dans les solutions ne contenant que des cations univalents, la liaison des anions domine tout à fait celle des cations.

Il faut distinguer plusieurs types d'interaction suivant la taille de l'anion envisagé : petits anions, colorants de type intermédiaire, et enfin, très gros anions du type des détergents.

Il est intéressant pour nous, d'étudier rapidement le premier type car, nos solutions contiennent des ions chlorure, acétate, barbiturate ou phosphate. On a trouvé que l'ordre d'affinité croissante pour les anions est :  
(75-76)

Chlorure < Bromure < Nitrate < Iodure



et d'autre part :

Bicarbonate < Acétate < Chlorure < Véronal < Citrate < Nitrate < Phtalate

Dans toutes les études, c'est aux pH acides que l'interaction entre les anions et l'albumine est la plus importante. On peut remarquer que cette interaction joue sur le point isoélectrique de l'albumine.

Plus il y a d'anions liés, plus le pH pour atteindre la condition isoélectrique est bas. Pour cette raison, et à cause de la liaison beaucoup plus forte des anions que des cations, le point isoélectrique de l'albumine décroît progressivement quand on augmente la force ionique<sup>(62)</sup>.

Il sera donc intéressant d'appliquer la méthode des coefficients de self-diffusion pour mettre en évidence ces interactions S.A.H.-anions, avec les anions qui accompagnent les cations dont on a désiré étudier l'interaction, mais également, avec les anions des milieux tampon utilisés. Ainsi nous verrons que les interactions entre l'ion acétate et la Serum Albumine Humaine sont mises en évidence par notre méthode. Le système Serum Albumine Humaine-ions chlore est étudié au laboratoire.

L'idéal serait de compléter les résultats concernant le nombre de cations liés par molécule de protéine par la connaissance du nombre des anions liés à la macromolécule pour chacun des milieux réactionnels utilisés. Ainsi la charge nette de la protéine serait déterminée et le facteur électrostatique calculé. Mais, on se heurte à des difficultés: la concentration en anion du milieu tampon est trop forte pour que la méthode des coefficients de self-diffusion puisse être utilisée aux forces ioniques où nous avons opéré.

D'autre part il y a sans doute compétition entre les anions du tampon et les ions chlorure, c'est une étude qui est en cours au laboratoire.

#### b) - Liaison avec les cations

Nous exposons dans ce paragraphe des généralités concernant la liaison entre la Serum Albumine Humaine et les cations. L'étude particulière des interactions entre la Serum Albumine Humaine et les ions  $\text{Ca}^{++}$ ,



$Zn^{++}$  et  $Cu^{++}$  sera faite aux prochains chapitres.

CARR<sup>(77)</sup> a étudié l'interaction du sodium et du potassium avec différentes protéines, il a montré que la Serum Albumine ne se lie pas avec ces ions monovalents. C'est un résultat qui n'a été controversé que par DOREMUS et JOHNSON<sup>(23)</sup>.

Par contre, nous verrons que, par la méthode des coefficients de self-diffusion, nous avons obtenu les mêmes résultats que la plupart des auteurs. Le Sodium, quelque soit le pH, ne se lie pas avec la Serum Albumine Humaine ou cette liaison est beaucoup trop faible pour que nous puissions la déceler.

Les ions divalents et polyvalents sont plus fortement liés que les ions monovalents non seulement par l'albumine, mais par les protéines en général.

Les protéines ont leurs points isoélectriques à pH acide, elles sont donc étudiées d'abord dans un état anionique.

L'attraction d'une protéine anionique pour un cation di ou trivalent sera donc plus grande que pour les cations monovalents par simple application de la loi de COULOMB. Cet effet est probablement suffisant pour expliquer l'augmentation de la liaison du calcium par rapport au sodium ou au potassium près du point isoélectrique.

Dans le cas des éléments des séries de transition, l'effet est totalement différent. De tels éléments, possédant des orbitales liantes nombreuses, sont capables de former des liaisons de type covalent avec divers groupes donneurs d'électrons. Il n'est pas surprenant que des ions de ce type soient plus fortement liés à l'albumine que les alcalinoterreux. L'existence de la coordination introduit une spécificité beaucoup plus grande dans la liaison.



## II - MESURE DU COEFFICIENT DE SELF-DIFFUSION DE LA SERUM ALBUMINE HUMAINE

Le coefficient de self-diffusion de l'Albumine Humaine a été déterminé pour deux températures, 25° et 37°, par la méthode du tube capillaire précédemment décrite au chapitre II, techniques expérimentales. L'isotope utilisé est l'I<sup>131</sup>, émetteur  $\gamma$  de période courte 8,06 jours.

La Serum Albumine Humaine ainsi marquée est livrée par le C.E.A. et nous avons choisi la catégorie d'échantillons réservés à l'étude du métabolisme de l'albumine.

Le faible coefficient de self-diffusion de l'albumine entraîne l'obligation d'employer des capillaires de longueur inférieure à 1 cm.

L'activité spécifique des solutions livrées par le C.E.A. étant assez faible, il est nécessaire de faire des corrections de concentration.

Du fait de la faible période de l'isotope employé, il faut tenir compte de la décroissance de la radioactivité.

Nous avons étudié  $D_{SAH}$ , coefficient de self-diffusion de l'Albumine, dans les milieux tampons suivants :

|                 |                  |                                                     |
|-----------------|------------------|-----------------------------------------------------|
| pH = 4,65       | $\Gamma/2 = 0,1$ | CH <sub>3</sub> COOK - CH <sub>3</sub> COOH - Cl K  |
| pH = 4,6 et 7,4 | $\Gamma/2 = 0,1$ | CH <sub>3</sub> COONa - CH <sub>3</sub> COOH - ClNa |
| pH = 8,6        | $\Gamma/2 = 0,1$ | Véronal                                             |
| pH = 7,4        | $\Gamma/2 = 0,1$ | Phosphate mono et disodique                         |

Les résultats sont portés dans les tableaux IV et V.

Les valeurs portées dans les tableaux IV et V seront utilisées dans les calculs de  $\bar{V}$  pour les systèmes S.A.H.-Zn<sup>++</sup> et S.A.H.-Ca<sup>++</sup>.





--- TABLEAU IV ---

$t = 25^{\circ}\text{C}$

| (S.A.H.)           | pH              | $D_{SAH} \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{s}$ |
|--------------------|-----------------|---------------------------------------------|
| $10^{-5}M$         | 4               | 0,540                                       |
| $10^{-5}M$         | 6               | 0,612                                       |
| $10^{-5}M$         | 7,4             | 0,614                                       |
| $10^{-5}M$         | 7,4 (Phosphate) | 0,620                                       |
| $10^{-5}M$         | 8,6 (Véronal)   | 0,620                                       |
| $3 \cdot 10^{-5}M$ | 4,65            | 0,65                                        |
| "                  | 7,4 (Phosphate) | 0,620                                       |
| "                  | 8,6 (Véronal)   | 0,610                                       |

--- TABLEAU V ---

$t = 37^{\circ}\text{C}$

| (S.A.H.)   | pH  | $D_{SAH} \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{s}$ |
|------------|-----|---------------------------------------------|
| $10^{-5}M$ | 4   | 0,842                                       |
| $10^{-5}M$ | 6   | 0,852                                       |
| $10^{-5}M$ | 7,4 | 0,895                                       |



-- CHAPITRE VI --



APPLICATION DE LA METHODE DES COEFFICIENTS DE SELF-DIFFUSION AUX INTERACTIONS  
ENTRE LA SERUM-ALBUMINE-HUMAINE ET LES IONS CALCIUM

-----

I - RAPPEL DES TRAVAUX DEJA EFFECTUES

On sait depuis longtemps qu'il existe des interactions entre l'albumine et les ions calcium dans le Serum puisque *PRIBRAM*<sup>(79)</sup> les a mises en évidence dès 1871.

Depuis, de nombreuses études ont été faites pour rendre compte quantitativement de la liaison entre les alcalinoterreux et la Serum Albumine Humaine.

*MAC LEAN et HASTINGS*<sup>(22-80)</sup> ont supposé que la combinaison du calcium et des protéines en solution peut être représentée quantitativement par la loi d'action de masse :

$$\frac{(\text{Ca}^{++}) (\text{Prot})}{(\text{Ca}^{++}\text{Prot})} = K \quad (39)$$

Ils ont déterminé la constante K par mesure de la solubilité du carbonate de calcium à 38°C pour diverses valeurs du pH. Les constantes d'ionisation des sels de calcium et de différentes protéines ont été calculées et *HASTINGS* a trouvé un  $pK = 2,32$  dans le cas de l'albumine.

Cependant, cette étude a été reprise par de nombreux auteurs en tenant compte des techniques de fractionnement des protéines par diverses méthodes.

*KATZ et KLÖTZ*<sup>(81)</sup> ont appliqué la méthode classique de dialyse d'équilibre et essayé de voir l'importance de différents facteurs tels que la



température et le pH sur la stabilité des complexes entre l'albumine de boeuf et les ions calcium.

Les mesures sont faites en milieu tamponné. Les auteurs ont trouvé que le nombre d'ions liés augmente quand le pH devient basique ce qui correspond à une interaction électrostatique plus importante entre la macromolécule chargée négativement et les ions  $\text{Ca}^{++}$  susceptibles de se lier.

Par contre, la liaison ne semble pas dépendre de la température.

KATZ et KLOTZ<sup>(81)</sup> pensent que le nombre d'ions  $\text{Ca}^{++}$  liés par molécule d'albumine atteint un palier pour chaque pH étudié, palier qu'ils n'ont pas déterminé avec précision.

CARR<sup>(82)</sup> a appliqué l'équation de Mc LEAN et HASTINGS pour quantifier les résultats expérimentaux. Il a employé une méthode potentiométrique pour déterminer l'activité des ions calcium en présence et en absence d'albumine de part et d'autre d'une membrane en collodion.

Il n'a pas tenu compte des variations de la force ionique du milieu réactionnel et de l'effet DONNAN qui dans ce cas doit être important. Les mesures sont faites au pH physiologique 7,4, le pH étant ajusté par addition de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  au milieu contenant  $\text{CaCl}_2$  et la protéine.

CARR a mis en évidence l'existence d'un palier correspondant à 10 ions  $\text{Ca}^{++}$  liés pour  $10^5$  g de protéine, quand on augmente la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  dans le milieu réactionnel. C'est d'ailleurs un résultat assez surprenant car l'albumine a 100 groupements carboxyle ionisés à ce pH donc capables de lier les ions  $\text{Ca}^{++}$ . Nous reviendrons sur ce point dans la discussion à la fin de ce chapitre, discussion de nos propres résultats par rapport à ceux de la littérature.

Cette même équation a été appliquée par I.R. HELD et S. FREEMAN<sup>(33)</sup> pour étudier la liaison du calcium aux protéines du plasma humain, dans des conditions ressemblant aux conditions physiologiques. Nous ne décrirons pas la méthode employée, l'ultracentrifugation (chapitre III).

L'intérêt de cet article est que les auteurs ont opéré dans un système "in vitro" mais contenant les principaux électrolytes du plasma, aux





concentrations trouvées dans les sangs d'individus normaux.

Dans leurs calculs, *HELD et FREEMAN* utilisent la relation d'*EDSALL*<sup>(83)</sup>.

$$\log K + \log A = \log \frac{\bar{v}}{n - \bar{v}} \quad (40)$$

où  $A$  est la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  libres,

$\bar{v}$  le nombre moyen d'ions  $\text{Ca}^{++}$  liés par molécule de Serum Albumine Humaine  
 $n$  est choisi égal à 8<sup>(82)</sup>.

Ils supposent donc qu'il y a un nombre maximum d'ions  $\text{Ca}^{++}$  liés par molécule de protéine.

La zone de pH étudiée est comprise entre 7,200 et 7,550 et la quantité d'ions  $\text{Ca}^{++}$  liés augmente légèrement quand le pH croît. La force ionique n'est pas tenue constante.

*ETTORI et SCOGGAN*<sup>(54-55)</sup> ont appliqué une méthode originale (chapitre III - I) pour déterminer les interactions entre  $\text{Ca}^{++}$  et l'albumine de boeuf. Ils ont déterminé le nombre d'ions liés par molécule de protéine en milieu véronal, pH 7,4, à 25°C en maintenant la force ionique constante,  $I/2 = 0,15$ . La représentation de *SCATCHARD* leur permet de mettre en évidence un nombre restreint de sites actifs, 3 ou 4. Leurs résultats se rapprochent de ceux de *KATZ et KLOTZ* (nombre de sites liants 5).

Par contre, *IRONS et PERKINS*<sup>(32)</sup>, en améliorant la méthode classique de dialyse d'équilibre par l'utilisation des isotopes radioactifs, ont pu comparer les interactions des ions magnésium, calcium et strontium avec l'albumine native ou modifiée chimiquement.

Ils ont montré que la liaison entre l'albumine et les cations métalliques étudiés ne commence que pour un pH supérieur à 5 et que le nombre des liaisons croît si le pH augmente.

La courbe représentant le nombre d'ions métalliques liés pour  $10^5$  g de protéine en fonction du pH montre combien l'effet de la charge nette est important. (Fig. 3).



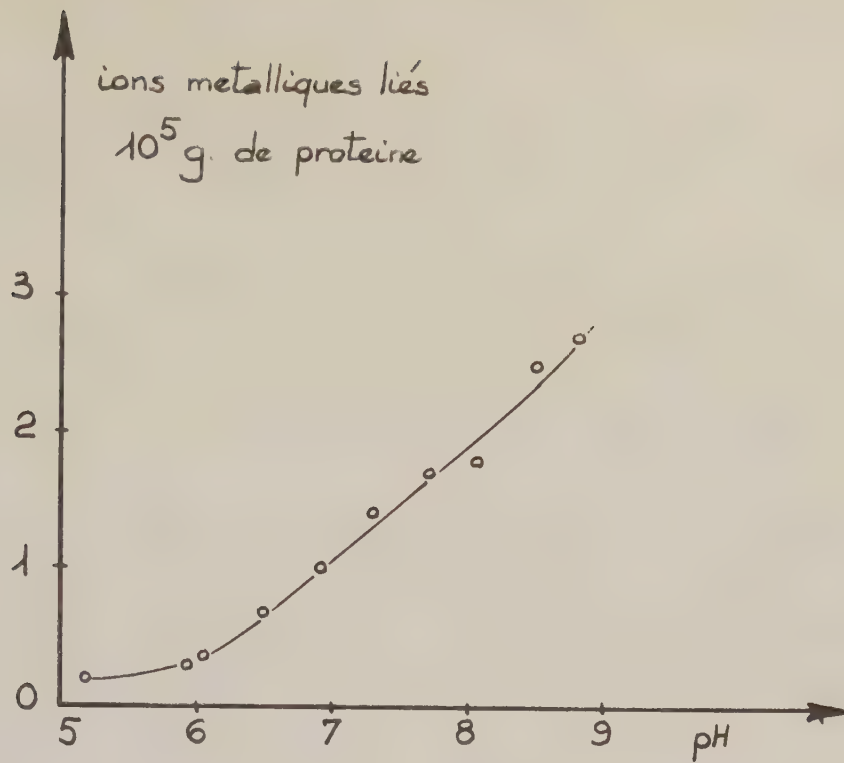


Fig. 3

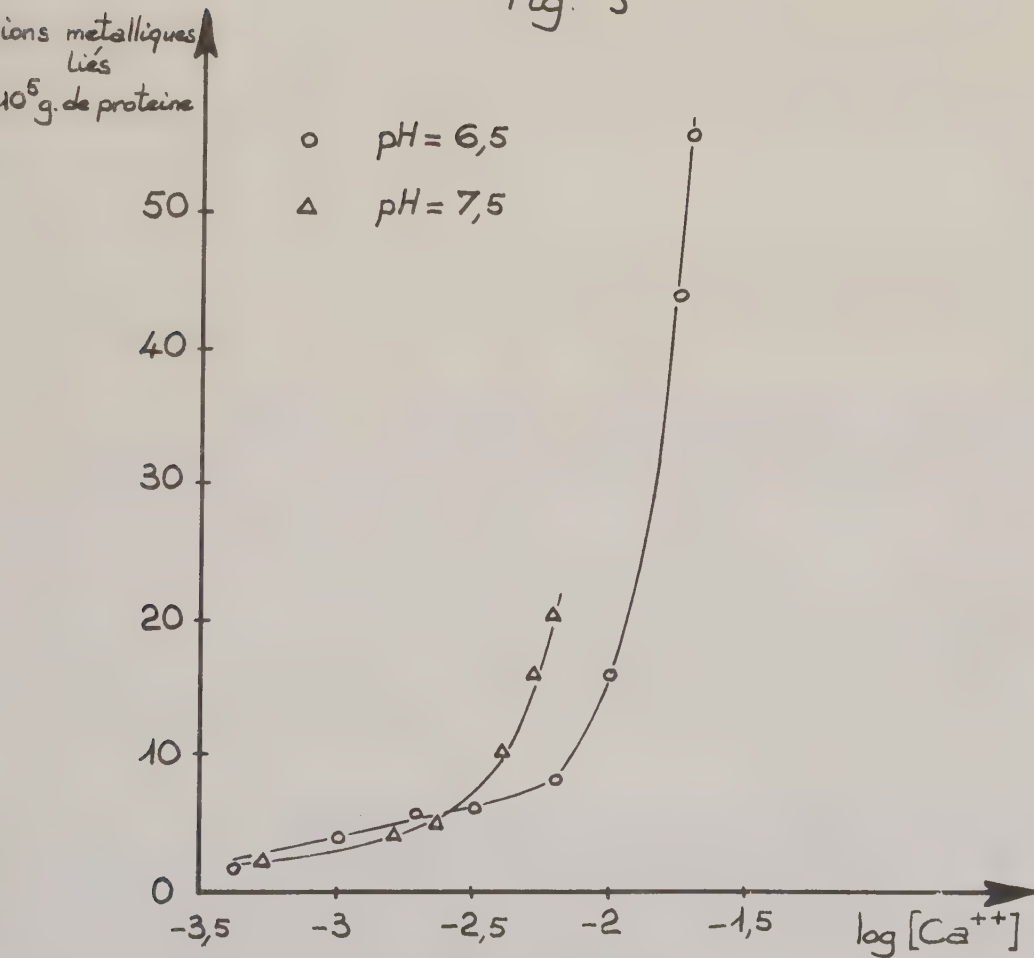


Fig. 4



Aux pH 7,5 et pH 6,5, il est intéressant de voir l'effet de l'accroissement de la concentration en ions métalliques libres sur l'engagement du calcium avec l'albumine. (Fig. 4).

Les résultats obtenus par PERKINS et IRONS sont donc fort différents de ceux observés par CARR<sup>(84)</sup> ou DOREHUS et JOHNSON<sup>(78)</sup> qui ont trouvé que le nombre de liaisons augmente jusqu'à ce qu'on atteigne un plateau pour une concentration en ions métalliques libres de 12mM.

Cependant les systèmes étudiés par ces auteurs ne contiennent pas d'autres ions que les ions calcium alors que PERKINS s'est placé en milieu tampon de force ionique  $I/2 = 0,1$ , acétate de sodium-acide acétique ou cacodylate de sodium. Il y a donc bien d'autres ions dans le milieu réactionnel que des ions calcium.

La liaison est plus importante à pH 7,5 qu'à pH 6,5. Or, la molécule d'albumine a le même nombre de sites liants possibles à ces deux pH. Ceci suggère que l'effet électrostatique intervient dans la liaison et qu'il est responsable de l'augmentation du nombre d'ions liés quand la concentration en sel augmente.

PERKINS a montré également que l'importance de la charge nette peut expliquer les résultats qu'il a obtenus pour des albumines modifiées chimiquement.

Une étude théorique a été entreprise par SAROFF et LEWIS<sup>(85)</sup> pour rendre compte des difficultés rencontrées dès que l'on veut interpréter les données expérimentales.

Ils ont mesuré, à la fois, les nombres de liaisons des ions calcium, des hydroxyles et des ions chlorure dans des solutions contenant de l'albumine déionisée, auxquelles on ajoute seulement de l'hydroxyde de calcium et du chlorure de calcium.

En supposant que les sites liants puissent être soit les groupements imidazole ou amino, soit les groupements carboxyle et en tenant compte de la formation possible de liaison hydrogène entre ces divers groupements, on peut calculer théoriquement le nombre d'ions calcium liés par molécule de protéine puis comparer les résultats théoriques aux valeurs expérimentales.



Il faut, bien sûr, tenir compte des effets électrostatiques et corriger les constantes intrinsèques de chacun des équilibres envisagés.

Cependant, LEWIS et SAROFF, eux mêmes, reconnaissent que l'albumine a un comportement tout à fait particulier quant à son affinité aussi bien envers les anions qu'envers les cations. Dans le domaine des pH acides, elle s'engage avec un nombre d'anions inférieur à celui que prévoit le calcul; dans la région des pH alcalins elle s'engage avec un nombre d'ions calcium inférieur à celui que prévoit le calcul théorique.

## II - RESULTATS EXPERIMENTAUX

Nous avons appliqué la méthode des coefficients de self-diffusion exposée au chapitre IV à l'étude des interactions entre l'ion calcium et la Serum Albumine Humaine. Nous avons donc mesuré le coefficient de self-diffusion de l'ion  $\text{Ca}^{++}$  en présence et en absence de protéine dans les mêmes milieux réactionnels convenablement choisis<sup>(86)</sup>.

Le nombre moyen d'ions calcium liés par molécule de protéine,  $\bar{v}$ , est calculé par l'équation (41).

$$\bar{v} = \frac{D_{\text{Ca}} - D_{\text{Ca}}^m}{D_{\text{Ca}} - D_{\text{SAH}}} \cdot \frac{(\text{Ca}^{++})_{\text{totale}}}{(\text{Prot})} \quad (41)$$

La concentration en albumine est fixée à  $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  pour les milieux tampon pH 4,65 et pH 7,4 et à  $10^{-5} \text{ M}$  pour le milieu de pH 8,6. Les coefficients de self-diffusion de l'albumine ont été mesurés dans ces milieux :

|           |                                       |
|-----------|---------------------------------------|
| pH = 4,65 | acétate de sodium-acide acétique      |
| pH = 7,4  | phosphate de sodium mono et disodique |
| pH = 8,6  | véronal.                              |

La force ionique est maintenue constante par addition de chlorure de sodium.  $I/2 = 0,1$ .

Les résultats,  $D_{\text{SAH}}$ , ont été donnés au chapitre précédent.





Dans le calcul de  $\bar{V}$ , par la formule (41), nous supposons que le coefficient de self-diffusion de l'albumine n'est pas modifié par la présence des ions calcium qui ont pu se lier. C'est une hypothèse qu'il nous a paru indispensable de vérifier avant d'entreprendre ce travail et nous avons mesuré le coefficient de self-diffusion de l'albumine marquée par l'iode  $I^{131}$  en milieu tampon acétate de sodium acide acétique de pH = 6 et en milieu véronal de pH = 8,6 pour une concentration en chlorure de calcium  $10^{-3}$  M.

Nous avons trouvé que  $D_{SAH}$  est égal à  $0,62 \cdot 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s. Donc, notre hypothèse se trouve vérifiée, le coefficient de self-diffusion de l'albumine n'est pas modifié par la présence des ions calcium.

1 - Milieu tampon, pH = 4,65,  $r/2 = 0,1$ ,  $t = 25^{\circ}C$

Pour le pH isoélectrique de l'albumine, il n'y a pas de différence entre  $D_{Ca}$  et  $D_{Ca}^m$  qui sont de l'ordre de  $0,73 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s quelle que soit la concentration en chlorure de calcium dans le milieu réactionnel. On peut donc penser qu'il n'y a pas d'interaction entre les molécules d'albumine et l'ion  $Ca^{++}$ , ou que cette interaction est trop faible pour être décelée par notre méthode.

2 - Milieu tampon, pH = 7,4,  $r/2 = 0,1$ ,  $t = 25^{\circ}C$

Nous avons fait varier la concentration en chlorure de calcium de  $4 \cdot 10^{-5}$  M à  $60 \cdot 10^{-5}$  M dans le milieu phosphate de sodium monosodique et phosphate de sodium disodique, au pH physiologique 7,4.

Il se pose certaines difficultés dues aux interactions entre l'ion phosphate et les ions calcium et nous n'avons pu poursuivre les expériences au-delà de la concentration  $60 \cdot 10^{-5}$  M en chlorure de calcium car il y a précipitation sans doute des phosphates de calcium très insolubles.

Les résultats expérimentaux sont portés dans le tableau VI et la figure 5 représente la variation de  $D_{Ca}$  et  $D_{Ca}^m$  en fonction de la concentration en chlorure de calcium.



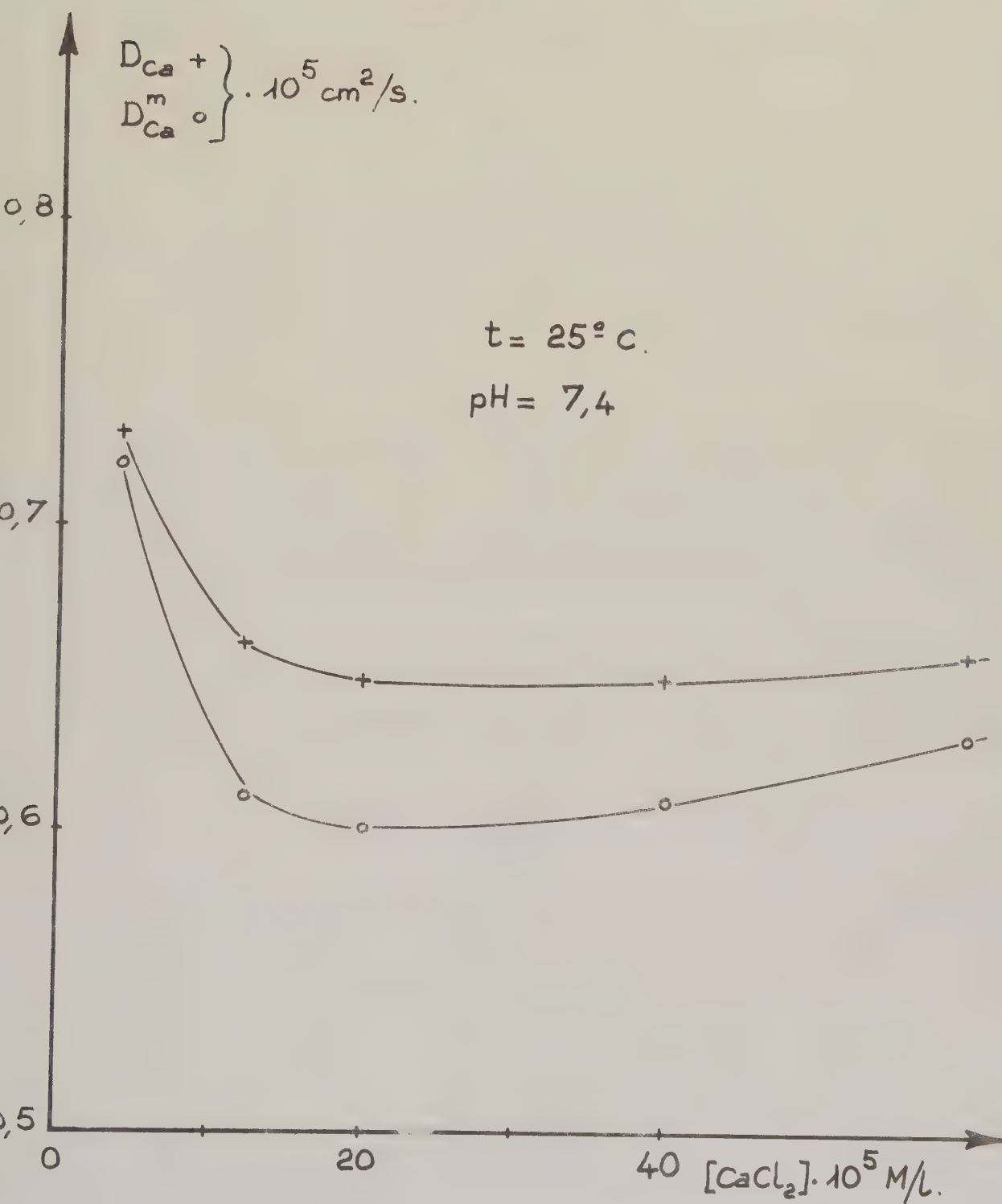


Fig. 5



--- TABLEAU VI ---

| $(\text{CaCl}_2) \times 10^5 \text{ M/l}$ | $D_{\text{Ca}}^m \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$ | $D_{\text{Ca}} \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$ | $\bar{v}$ |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------|
| 4                                         | 0,72                                                | 0,73                                              | 0,03      |
| 12                                        | 0,62                                                | 0,66                                              | 0,40      |
| 20                                        | 0,61                                                | 0,65                                              | 0,70      |
| 40                                        | 0,62                                                | 0,65                                              | 1,00      |
| 60                                        | 0,63                                                | 0,66                                              | 1,6       |

Les valeurs de  $\bar{v}$  obtenues sont portées en fonction de la concentration en chlorure de calcium sur la figure 6. Il semble que  $\bar{v}$  augmente régulièrement quand la concentration en chlorure de calcium augmente dans le domaine étudié. La précision des mesures de  $\bar{v}$  est cependant faible à cause des interactions entre le milieu tampon et les ions calcium.

Il est nécessaire de vérifier que l'abaissement du coefficient de self-diffusion des ions calcium en présence de Serum Albumine n'est pas dû à une augmentation de la viscosité des solutions protéiques. (Tableau VII).

--- TABLEAU VII ---

| $(\text{CaCl}_2) \times 10^5 \text{ M}$ | $\eta_{\text{S.A.H.}}$ | $\eta$ | $\eta_{\text{S.A.H.}}/\eta$ |
|-----------------------------------------|------------------------|--------|-----------------------------|
| 4                                       | 0,972                  | 0,971  | 1,001                       |
| 12                                      | 0,976                  | 0,975  | 1,001                       |
| 40                                      | 0,979                  | 0,977  | 1,002                       |
| 60                                      | 0,980                  | 0,977  | 1,003                       |





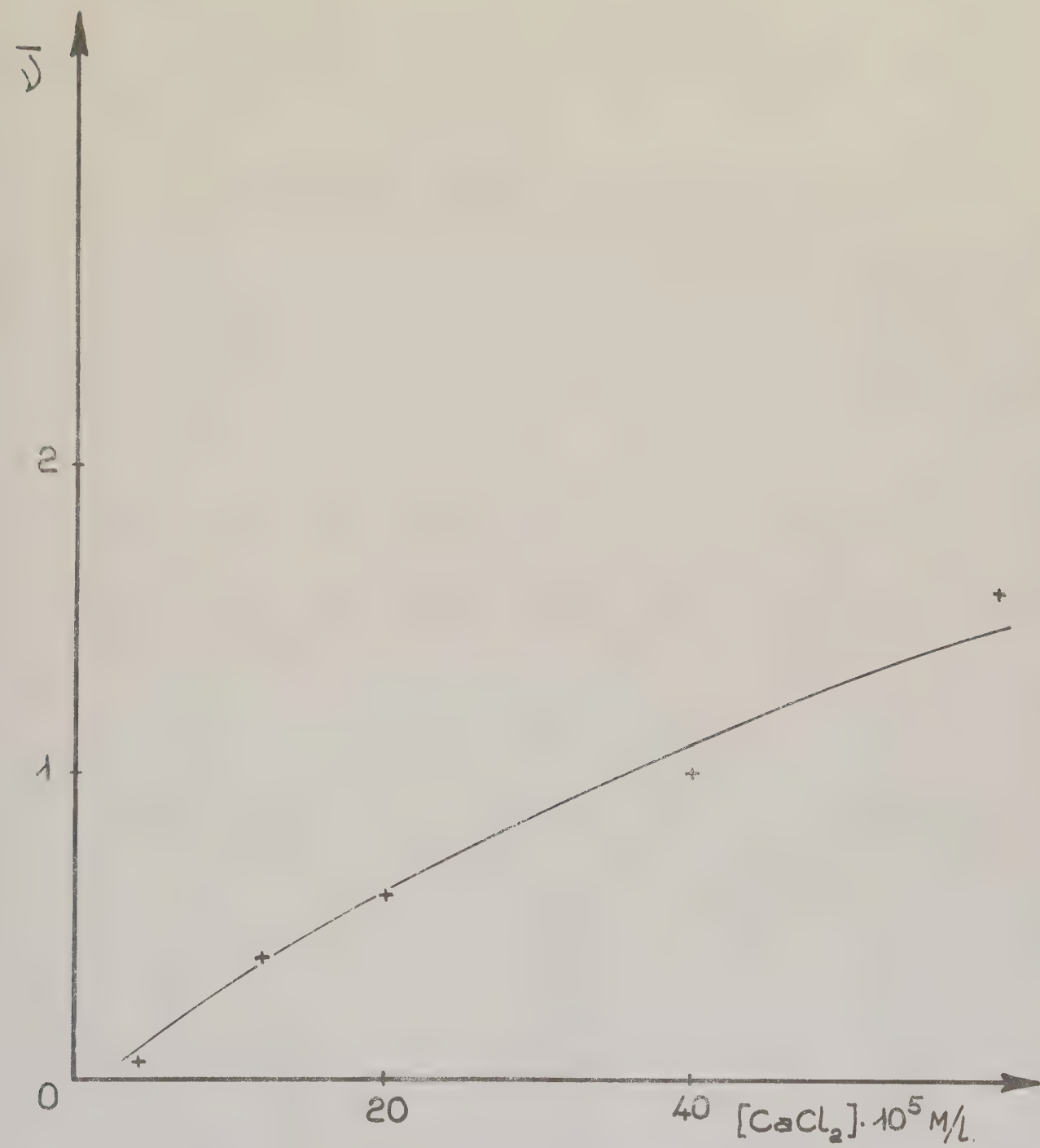


Fig. 6



Les rapports  $\eta_{S.A.H}/\eta$  des viscosités des solutions protéiques par rapport aux viscosités des solutions identiques mais sans protéine sont très voisins de l'unité, et la légère augmentation de viscosité des solutions protéiques n'influe pas sur les coefficients de self-diffusion de l'ion calcium. La correction que l'on peut apporter en considérant que  $D \cdot \eta = \text{cte}$  entre dans le domaine d'erreur de la mesure des coefficients de self-diffusion.

3. - Milieu tampon véronal, pH = 8,6,  $\Gamma/2 = 0,1$ ,  $t = 25^\circ\text{C}$

Le milieu véronal a été choisi car les immunologistes l'emploient fréquemment. Les expériences d'URIEL, dans un gel d'agar-agar, qui ont permis de mettre en évidence la différence de comportement des ions métalliques en présence des protéines sériques ont été faites dans ce milieu tampon.

Les résultats expérimentaux sont portés dans le tableau VIII. Rappelons que la concentration en albumine est fixée à  $10^{-5}\text{M}$ .

Les variations de  $D_{\text{Ca}}$  et  $D_{\text{Ca}}^m$  en fonction de la concentration en chlorure de calcium sont représentées sur la figure 7.

--- TABEAU VIII ---

| $(\text{CaCl}_2) \times 10^3 \text{M}$ | $D_{\text{Ca}}^m \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$ | $D_{\text{Ca}} \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$ |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 0,2                                    | 0,66                                                | 0,68                                              |
| 2                                      | 0,63                                                | 0,66                                              |
| 5                                      | 0,60                                                | 0,62                                              |
| 10                                     | 0,59                                                | 0,61                                              |
| 16                                     | 0,61                                                | 0,63                                              |
| 40                                     | 0,74                                                | 0,77                                              |



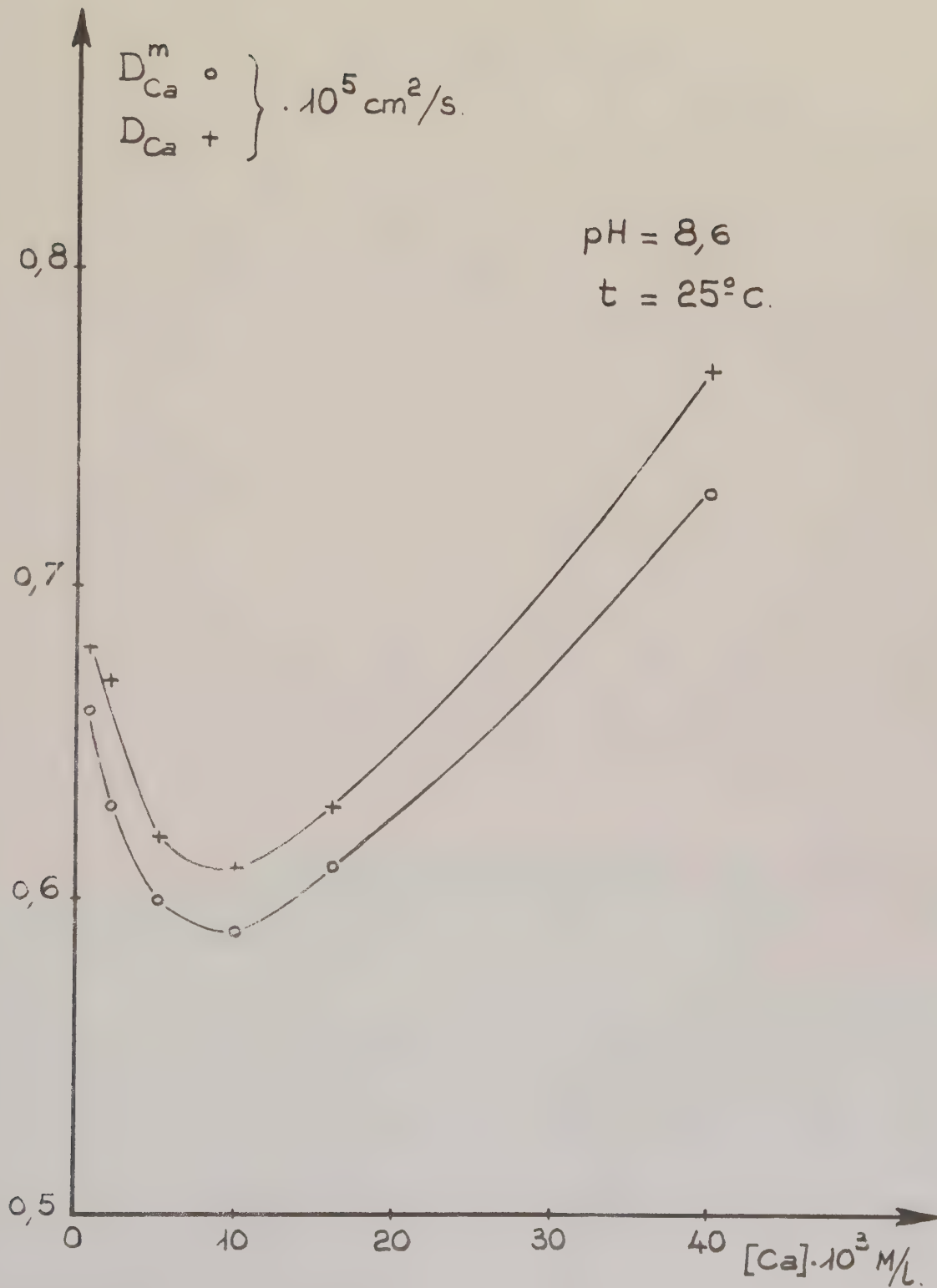


Fig. 7



De même que pour le tampon de pH 7,4, nous avons mesuré la viscosité des différentes solutions étudiées. (Tableau IX).

--- TABLEAU IX ---

| $(\text{CaCl}_2) \times 10^3 \text{M}$ | $\eta$ | $\eta_{\text{S.A.H.}}$ | $\eta_{\text{S.A.H.}}/\eta$ |
|----------------------------------------|--------|------------------------|-----------------------------|
| 0,2                                    | 0,941  | 0,945                  | 1,004                       |
| 2                                      | 0,942  | 0,947                  | 1,006                       |
| 5                                      | 0,943  | 0,951                  | 1,008                       |
| 10                                     | 0,944  | 0,953                  | 1,009                       |
| 20                                     | 0,947  | 0,954                  | 1,007                       |
| 40                                     | 0,954  | 0,956                  | 1,002                       |

Ici encore, la correction de viscosité est négligeable.

Nous avons pu tenir compte des interactions entre l'ion calcium et le tampon véronal car des études ont été faites sur ce problème par SCHUBERT<sup>(87)</sup>.

Il a déterminé la constante d'association du complexe Ca-Véronal,

$$K_{\text{CaVéronal}}^{\text{ass}} = 4,3.$$

On peut donc faire les corrections de concentration en ions calcium libres susceptibles de se lier à la protéine et intervenant dans la formule (41).

$$(\text{Ca}^{++}) = (\text{Ca}^{++})_{\text{totale}} - K (\text{Ca}^{++})_{\text{tot}} (\text{Véronal}) \quad (42)$$

Les résultats sont portés dans le tableau X





--- TABLEAU X ---

| $(\text{CaCl}_2)_{\text{totale}} \times 10^3 \text{M/l}$ | $(\text{Ca}^{++}) \times 10^3 \text{M/l}$ | $\bar{v}$ |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------|
| 0,2                                                      | 0,114                                     | 0,37      |
| 2                                                        | 1,14                                      | 6         |
| 5                                                        | 2,85                                      | 10        |
| 10                                                       | 5,7                                       | 20        |
| 16                                                       | 9,12                                      | 32        |
| 40                                                       | 22,8                                      | 96        |

Sur la figure 8, nous avons porté les variations de  $\bar{v}$  en fonction de la concentration en chlorure de calcium.  $\bar{v}$  augmente très rapidement à partir d'une concentration de  $10^{-2} \text{M}$  en chlorure de calcium.

### III - DISCUSSION

Il est intéressant de porter sur un même graphique les variations de  $\bar{v}$  en fonction de la concentration en chlorure de calcium pour les deux pH étudiés, 7,4 et 8,6. Le domaine de concentration étudié variant de  $4 \cdot 10^{-5} \text{M}$  à  $4 \cdot 10^{-2} \text{M}$ , nous avons porté  $\bar{v}$  en fonction du logarithme décimal de la concentration en chlorure de calcium (Tableau XI et Figure 9).



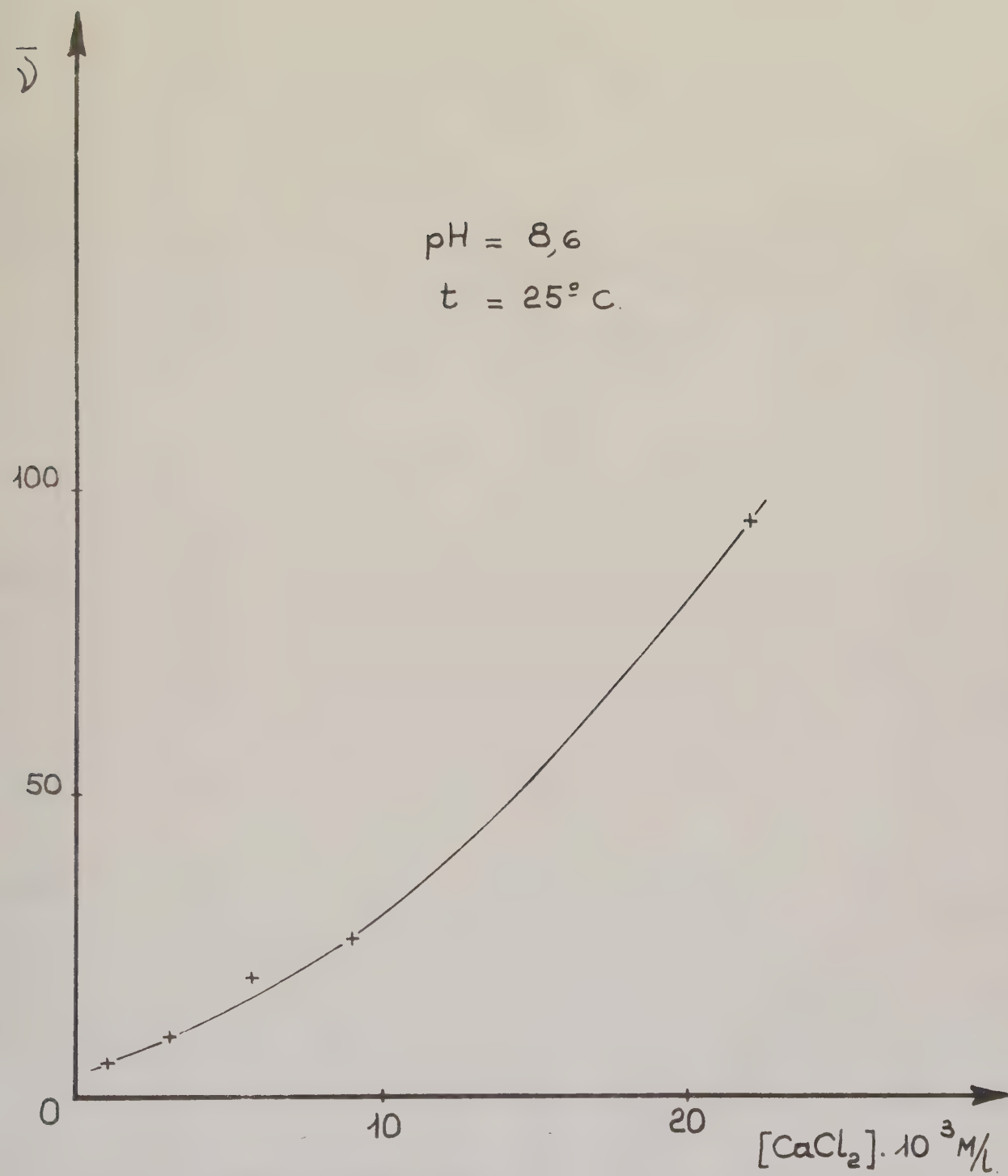


Fig. 8



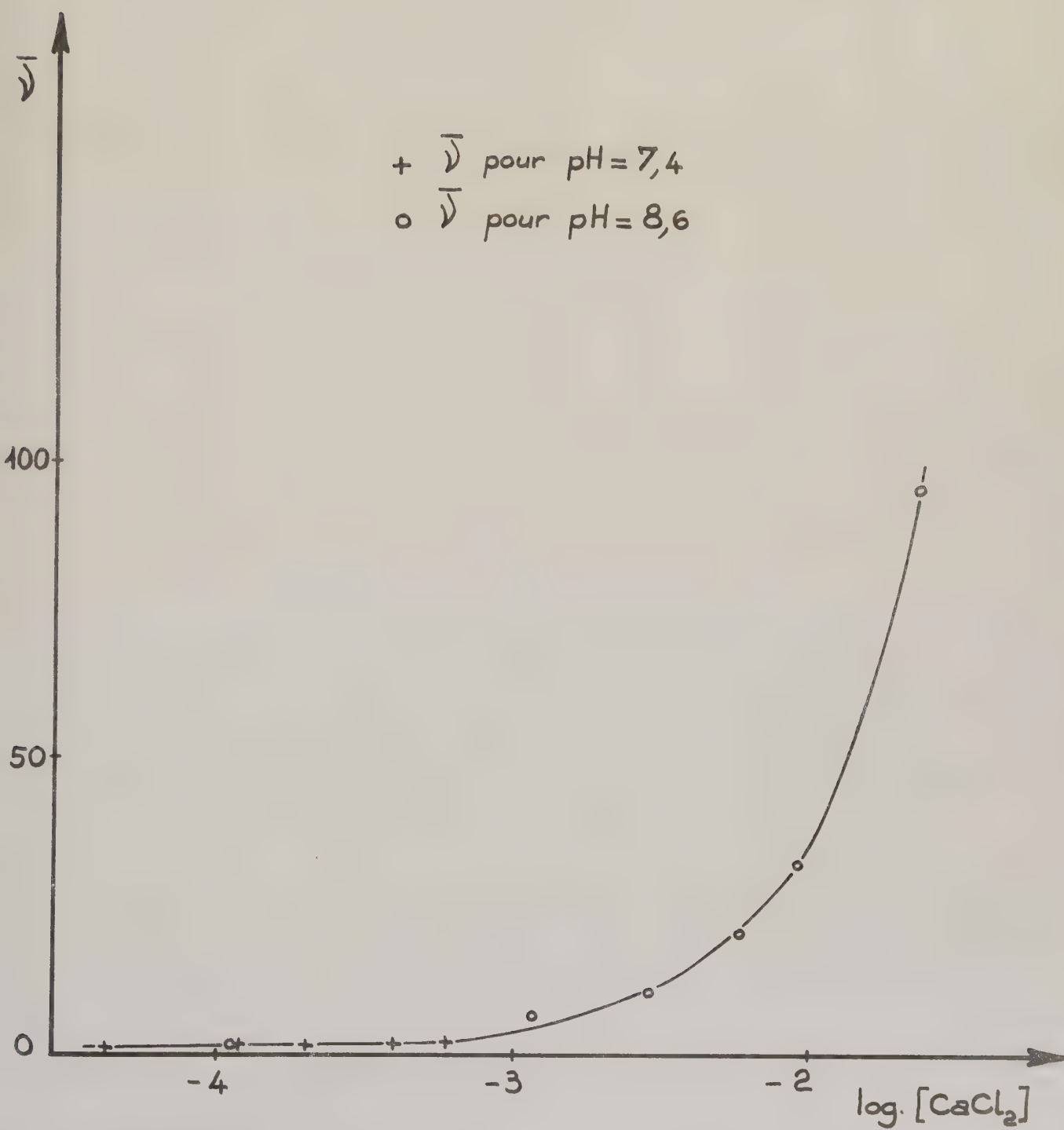


Fig. 9





--- TABLEAU XI ---

| pH  | Log (CaCl <sub>2</sub> ) | $\bar{v}$ |
|-----|--------------------------|-----------|
| 7,4 | - 4,39                   | 0,03      |
| "   | - 3,92                   | 0,4       |
| "   | - 3,69                   | 0,7       |
| "   | - 3,39                   | 1,0       |
| "   | - 3,22                   | 1,6       |
| 8,6 | - 3,94                   | 0,4       |
| "   | - 2,94                   | 6         |
| "   | - 2,54                   | 10        |
| "   | - 2,24                   | 20        |
| "   | - 2,04                   | 32        |
| "   | - 1,64                   | 96        |

La figure 9 montre que l'interaction entre les ions calcium et l'albumine doit d'abord intervenir sur des sites spécifiques peu nombreux, où sans doute, la spécificité de la liaison et les effets électrostatiques concourent. Puis, quand on augmente la concentration en chlorure de calcium dans le milieu, l'interaction électrostatique est responsable de la partie linéaire de pente importante de la courbe  $\bar{v} = f(\log (\text{CaCl}_2))$ .

Il ne semble pas qu'il y ait une augmentation du nombre d'ions calcium liés quand le pH croît de 7,4 à 8,6 mais il y a trop peu de mesures faites à ces deux pH pour une même concentration en chlorure de calcium pour que nous puissions conclure sur ce point précis.

La méthode des coefficients de self-diffusion nous a donc permis de mettre en évidence les interactions entre l'ion calcium et la Serum Albumine Humaine.



Au point isoélectrique de l'albumine,  $\text{pH} = 4,65$ , nous n'avons pas décelé d'interactions ce qui est conforme aux résultats obtenus par tous les auteurs que nous avons cités.

Aux  $\text{pH} 7,4$  et  $8,6$ , l'interaction entre l'ion calcium et l'albumine se manifeste par un abaissement du coefficient de self-diffusion du calcium en présence de protéine, et, nous avons pu calculer le nombre moyen,  $\bar{v}$  d'ions calcium liés par molécule d'albumine.

Nous n'avons pas trouvé de palier pour la courbe  $\bar{v} = f([\text{CaCl}_2])$  quand la concentration en chlorure de calcium augmente dans le milieu réactionnel, résultat identique à celui de *PERKINS*. Par contre, comme la plupart des auteurs cités, nous avons pu mettre en évidence une certaine spécificité de la liaison calcium-albumine.

Cette étude doit être continuée par des mesures identiques, mais en présence d'albumine modifiée chimiquement.



== CHAPITRE VII ==



APPLICATION DE LA METHODE DES COEFFICIENTS DE SELF-DIFFUSION A L'ETUDE DES  
INTERACTIONS ENTRE LE ZINC ET L'ALBUMINE



I - RAPPEL DES TRAVAUX DEJA EFFECTUES

Les interactions entre les protéines et l'ion zinc ont donné lieu à plus d'études quantitatives que celles entre les protéines et l'ion calcium. Les métaux de transition, nous l'avons précédemment remarqué, se lient à l'albumine beaucoup plus fortement que les métaux alcalins et alcalinoterreux; en effet, ils se combinent aux sites actifs de la protéine par des liaisons de type covalent et les complexes de coordination formés sont en équilibre avec la protéine libre, de telle sorte que la réaction peut être formulée en fonction d'une ou plusieurs constantes d'association.

D'autre part, l'affinité des protéines pour l'ion zinc permet de l'utiliser pour précipiter spécifiquement divers composés du plasma.

Souvent, on a étudié la compétition entre l'ion zinc et l'ion cuivrique, surtout par des mesures d'absorption, le cuivre donnant des complexes qui ont un maximum d'absorption dans la région visible ou l'U.V.

Au chapitre VIII nous exposerons les résultats obtenus par la méthode des coefficients de self-diffusion en ce qui concerne les interactions entre l'albumine et le cuivre et nous pourrons alors comparer ces résultats avec ceux que l'on trouve pour le zinc.

GURD et GOODMAN<sup>(29)</sup> ont étudié la liaison de l'ion zinc avec la Serum Albumine Humaine dans un domaine de pH de 5,0 à 6,8 en employant la dialyse d'équilibre. Aucun tampon n'est utilisé dans ces expériences; les solutions sont maintenues à une force ionique constante,  $\mu = 0,15$ , par addition de  $\text{NaNO}_3$  et on fait varier le pH en ajoutant une solution de soude.



Leurs résultats expérimentaux montrent que :

- 1) - Le zinc se lie à une seule classe de sites dans le domaine de pH étudié, la réaction est réversible.
- 2) - Le zinc est en compétition avec un proton pour le même ligande.
- 3) - Ce ligande est la partie imidazole des résidus histidine.
- 4) - Le zinc et l'imidazole sont dans le rapport 1/1.

CURD et GOODMAN pensent que ni les groupements carboxyle, ni les groupes ε amino sont impliqués dans la liaison à pH = 6.

Ils trouvent que la constante intrinsèque de la réaction est  $\log K_o = 2,82$ . Cette valeur reste constante quand le pH varie de 5 à 7.

Ceci correspond à la constante d'association entre l'imidazole et l'ion zinc dans les mêmes conditions expérimentales ( $\log k_{Im} = 2,76$ ).

CURD<sup>(89)</sup> a étudié l'effet de la température sur l'interaction entre les ions zinc et la mercaptalbumine. La mercaptalbumine diffère de l'albumine par le nombre de sulfhydryles et ne contient pas le même nombre de groupements anioniques. Cependant, la mercaptalbumine et l'albumine lient le même nombre d'ions zinc pour une même concentration en ions métalliques dans les solutions étudiées.

Si la température passe de 0°C à 25°C, l'effet du changement de température sur l'importance de la liaison est peu visible, alors que, si la température passe de 25°C à 37°C, il y a une augmentation très nette du nombre d'ions zinc liés. En même temps, on observe des changements irréversibles dans la solubilité de la protéine.

Des résultats non publiés de CURD donnent jusqu'à 30 ions zinc liés par molécule d'albumine.

Il y a donc, en plus des groupements imidazole, d'autres sites susceptibles de lier les ions zinc, par exemple les groupements phénoxydes des résidus tyrosine, au nombre de 18. D'autre part, la molécule d'albumine ayant une structure très flexible, il n'est pas impossible que des résidus tels que la tyrosine, les acides aspartique et glutamique puissent former de nouveaux sites du type chélate.





Cependant, pour que les études sur les interactions entre les protéines et les métaux soient fructueuses, il est intéressant d'opérer en milieu tampon ainsi que le soulignent *LAL et coll.*<sup>(59)</sup>. Le tampon choisi est le tampon acétate de sodium-acide acétique de pH = 6,5, la force ionique est maintenue constante,  $\mu = 0,20$ .

*LAL* reconnaît d'ailleurs qu'il se pose un problème nouveau dû à l'introduction des ions acétate et il suppose que dans le milieu réactionnel les ions métalliques existent en grande partie sous forme  $MAc^+$ , ce complexe participant au processus de liaison. Les résultats expérimentaux que nous avons obtenus, montrent également une interaction entre les ions zinc et les ions acétate.

*LAL* pense que le zinc se lie d'abord sur les groupements imidazole de la protéine, puis les groupements carboxyle doivent participer au processus d'interaction après qu'une petite partie des ions métalliques se soit liée.

*SAROFF et MARK*<sup>(90)</sup>, dans le même milieu tampon, à pH = 6,1, par polarographie et par équilibre de dialyse, ont pu montrer que le zinc se lie à l'albumine de boeuf sur 8 sites identiques, sans doute les sites imidazole, avec une constante de liaison  $\log k = 3,08$ .

Leurs résultats sont confirmés par *TANFORD*<sup>(91)</sup> qui situe la liaison des ions  $Cd^{II}$  et  $Zn^{II}$  principalement sur les groupements imidazole de la Serum Albumine de Boeuf.

La méthode employée par *TANFORD* est la polarographie. Il suppose que le coefficient de diffusion de l'ion métallique lié à la protéine est le même que celui de la protéine seule, hypothèse qui est vérifiée par nos expériences. Il trouve que la liaison commence pour pH = 5,3.

*RAO et LAL*<sup>(41)</sup> ont déduit de cette même méthode certains faits fort intéressants; ils ont travaillé en milieu tampon acétate, le pH variant de 5,1 à 6,58 et ils ont pu tenir compte des interactions entre le tampon et l'ion zinc. Ils ont également étudié la compétition entre l'ion cadmium et l'ion zinc dans ce même milieu. Les constantes intrinsèques de la réaction du  $Zn^{II}$  et de la réaction du  $Cd^{II}$  avec l'albumine de boeuf, en supposant que l'interaction a lieu sur des sites imidazole sont respective-



ment  $\log k_{\text{Zn}^{\text{II}}} = 3,87$  et  $\log k_{\text{Cd}^{\text{II}}} = 3,84$ . Ces valeurs sont plus grandes que celles des constantes des systèmes imidazole- $\text{Zn}^{\text{II}}$  et imidazole- $\text{Cd}^{\text{II}}$ . *RAO et LAL* pensent donc que la liaison a d'abord lieu sur des sites plus réactifs que l'imidazole : par exemple un site chélate formé par un groupement imidazole et un groupement carboxyle voisin.

Ils ont confirmé ces résultats<sup>(92)</sup>, en utilisant d'autres méthodes, telles la dialyse d'équilibre, pour les interactions entre l'albumine et divers métaux bivalents,  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Co}^{\text{II}}$ ,  $\text{Cd}^{\text{II}}$ .

Pour les ions cuivre, zinc et cadmium, ils retrouvent bien que l'interaction a d'abord lieu sur 2 ou 3 sites. Puis, le métal forme un complexe simple 1/1 avec l'imidazole et la constante intrinsèque obtenue alors a la même valeur que celle obtenue par *GURD et GOODMAN*.

Par contre, les résultats de *WALDMAN-MEYER*<sup>(61)</sup>, parus dans une publication plus récente s'accordent tout à fait avec les résultats de *GURD*. Par électrophorèse de zone, à 25°C et en tampon acétate de sodium, il a calculé les valeurs des constantes intrinsèques de l'équilibre  $\text{Zn}^{++}$ -S.A.H.

Pour une force ionique  $\mu = 0,15$ ,  $\log k = 2,76$  et si la force ionique est 0,28,  $\log k = 2,54$ . Cependant il arrive à la conclusion qu'il existe 17 sites actifs susceptibles de lier le zinc ce qui est en désaccord avec les résultats des auteurs cités jusqu'à présent.

Ainsi, *GIROTTI*<sup>(42)</sup> a également trouvé un nombre de sites liants faibles, 3,3 atomes g de zinc se lient par mole d'albumine à pH = 8,1 et un maximum de 6,6 atomes g de zinc par mole à pH = 9 (tampon borate pour pH = 8,1 et milieu non tamponné pour pH = 9).

Nous décrirons plus en détail le travail de *PERKINS*<sup>(31)</sup>. Il étudie, en effet, les interactions entre l'albumine et les ions métalliques par la méthode de dialyse d'équilibre en faisant varier le pH des milieux tampon utilisés dans un large domaine. Pour essayer d'élucider la question des sites actifs responsables de cette liaison, il modifie chimiquement l'albumine : acétylation, désamination, estérification de la protéine.



Les résultats expérimentaux obtenus permettent de montrer que le pH de liaison maximale est entre 7 et 8, au-delà il y a une brusque décroissance du nombre d'ions liés par molécule d'albumine.

Le maximum de liaison pour le zinc est de  $8 \pm 1$  atome g de zinc pour  $10^5$  g d'albumine (pH = 8,  $\Gamma/2 = 0,15$ ). Aucun ion zinc ne se lie à pH = 4,3.

L'acétylation de l'albumine humaine entraîne une augmentation de ce nombre maximum d'ions liés jusqu'à une valeur de  $9,5 \pm 1$  atome g de zinc pour  $10^5$  g d'albumine. La désamination a un effet semblable, moins marqué. L'estérification des groupements carboxyle abaisse ce nombre à moins d'un atome g de zinc pour  $10^5$  g de protéine à un pH = 7,5. Puisque l'estérification n'affecte pas les groupements imidazole des résidus histidiniques mais que cependant elle fait diminuer le nombre des liaisons, PERKINS suggère que les groupements carboxyle jouent un rôle important.

Il faut remarquer que tous les auteurs cités ont trouvé que le nombre d'ions liés par molécule d'albumine est faible donc que le nombre de sites actifs doit aussi être faible. Certains rendent les groupements imidazole responsables de la liaison avec le zinc, (GURD et GOODMAN, SAROFF et MARK, RAO et LAL, WALDMAN-MEYER) mais ils ne sont plus en aussi bon accord quant au nombre d'ions liés donc au nombre et aux propriétés des sites actifs : WALDMAN-MEYER suggère qu'il y a 17 sites actifs à pH=7,1, alors que RAO a mis en évidence 2 ou 3 sites spécifiques.

Donc, il est peut-être un peu simpliste de considérer que seuls les groupements imidazole participent à la liaison et ce fait a été clairement démontré par PERKINS quand il estérifie la molécule d'albumine. Les groupements carboxyle participent sans doute à la liaison avec les groupements imidazole et la charge électro négative portée par la macromolécule influe également sur la liaison.





## II - NOS RESULTATS EXPERIMENTAUX

Nous avons essayé de mettre en évidence la formation des complexes entre l'albumine et l'ion zinc par mesure des coefficients de self-diffusion de l'ion zinc en présence et en absence de macromolécule.

Les mesures ont été faites à deux températures, 25°C et 37°C, puisque GURD a signalé que le nombre d'ions zinc liés par molécule de protéine croît entre ces deux températures.

On a utilisé le milieu tampon acétate de sodium-acide acétique pour les pH 4,6, 6,3, 7,4 et le milieu véronal pour pH = 8,6.

La formule utilisée pour calculer le nombre moyen,  $\bar{v}$ , d'ions zinc liés par molécule d'albumine est :

$$\bar{v} = \frac{D_{Zn} - D_{Zn}^m}{D_{Zn} - D_{S.A.H.}} \times \frac{(Zn^{++})_{totale}}{(S.A.H.)} \quad (43)$$

La concentration en albumine est fixée à  $10^{-5}M$  dans toutes nos expériences, la force ionique est constante,  $I/2 = 0,1$ .

De même qu'en présence des ions calcium nous avons vérifié que le coefficient de self-diffusion de l'albumine n'était pas modifié, (chapitre VI), avant ce travail nous avons mesuré le coefficient de self-diffusion de l'albumine en milieu tampon de pH = 7,4, pour une concentration en chlorure de zinc  $10^{-3}M$ .

Nous avons trouvé  $D_{S.A.H.} = 0,618 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  à 25°C.

### 1 - Etude des interactions entre l'albumine et l'ion zinc à 25°C

#### a) Milieu tampon acétate de sodium-acide acétique, pH = 4

$D_{Zn}$  et  $D_{Zn}^m$  sont mesurés dans les mêmes conditions, le même milieu tampon, la même force ionique, la même concentration en chlorure de zinc.

Nous avons porté (figure 10) les coefficients de self-diffu-



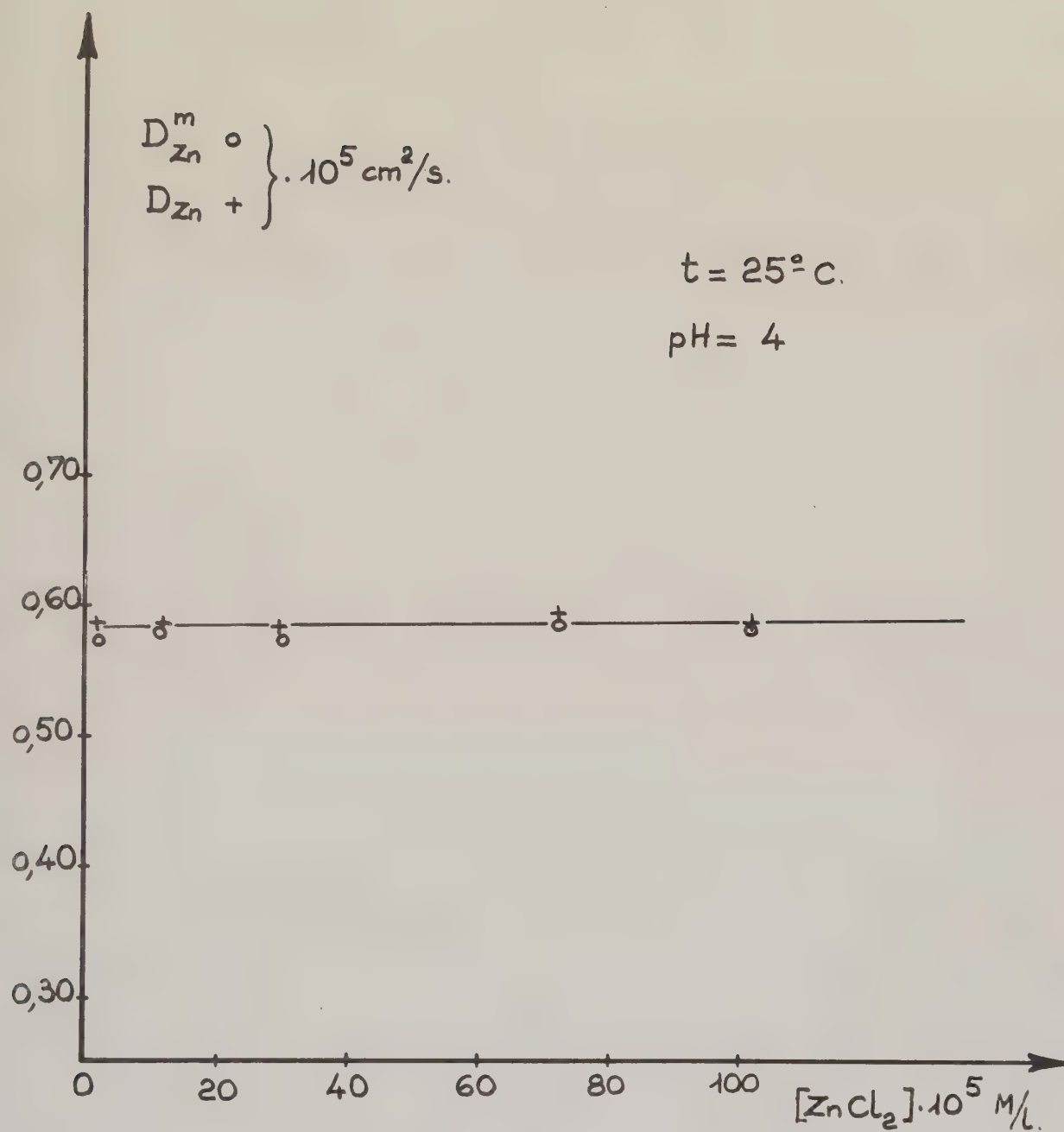


Fig. 10



sion  $D_{Zn}$  et  $D_{Zn}^m$  en fonction de la concentration en chlorure de zinc.

Quelle que soit la concentration en  $ZnCl_2$ ,  $D_{Zn}$  est égal à  $D_{Zn}^m$ , donc, d'après la formule (43), il n'y a pas d'ion zinc lié à la molécule de protéine, ou l'interaction est trop faible pour être décelée par notre méthode.

Comme PERKINS et de nombreux auteurs ont montré que pour une telle valeur du pH, il n'existe pas de liaison entre S.A.H. et  $Zn^{++}$ , nous voyons que la mesure des coefficients de self-diffusion se révèle, comme dans le cas du calcium, être une méthode très sensible pour tester s'il y a ou non interaction.

b) Milieu acétate de sodium-acide acétique, pH = 6,3

La figure (11) permet d'observer une diminution déjà nette du coefficient de self-diffusion de l'ion zinc dans les solutions d'albumine. A partir de ces courbes nous avons donc pu calculer  $\bar{v}$ , le nombre moyen d'ions zinc liés par molécule de Serum Albumine Humaine et porter  $\bar{v}$  en fonction de la concentration en chlorure de zinc. (Fig. 14) (Tableau XII).

--- TABLEAU XII ---

| $(ZnCl_2) \times 10^5 M/l$ | $D_{Zn} \times 10^5 cm^2/s$ | $D_{Zn}^m \times 10^5 cm^2/s$ | $\bar{v}$ |
|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------|
| 1,441                      | 0,52                        | 0,44                          | 0,25      |
| 10,1                       | 0,57                        | 0,50                          | 1,2       |
| 28,8                       | 0,59                        | 0,55                          | 2,2       |
| 50,4                       | 0,60                        | 0,57                          | 2,8       |
| 80                         | 0,60                        | 0,58                          | 3,5       |
| 100                        | 0,60                        | 0,59                          | 3,7       |



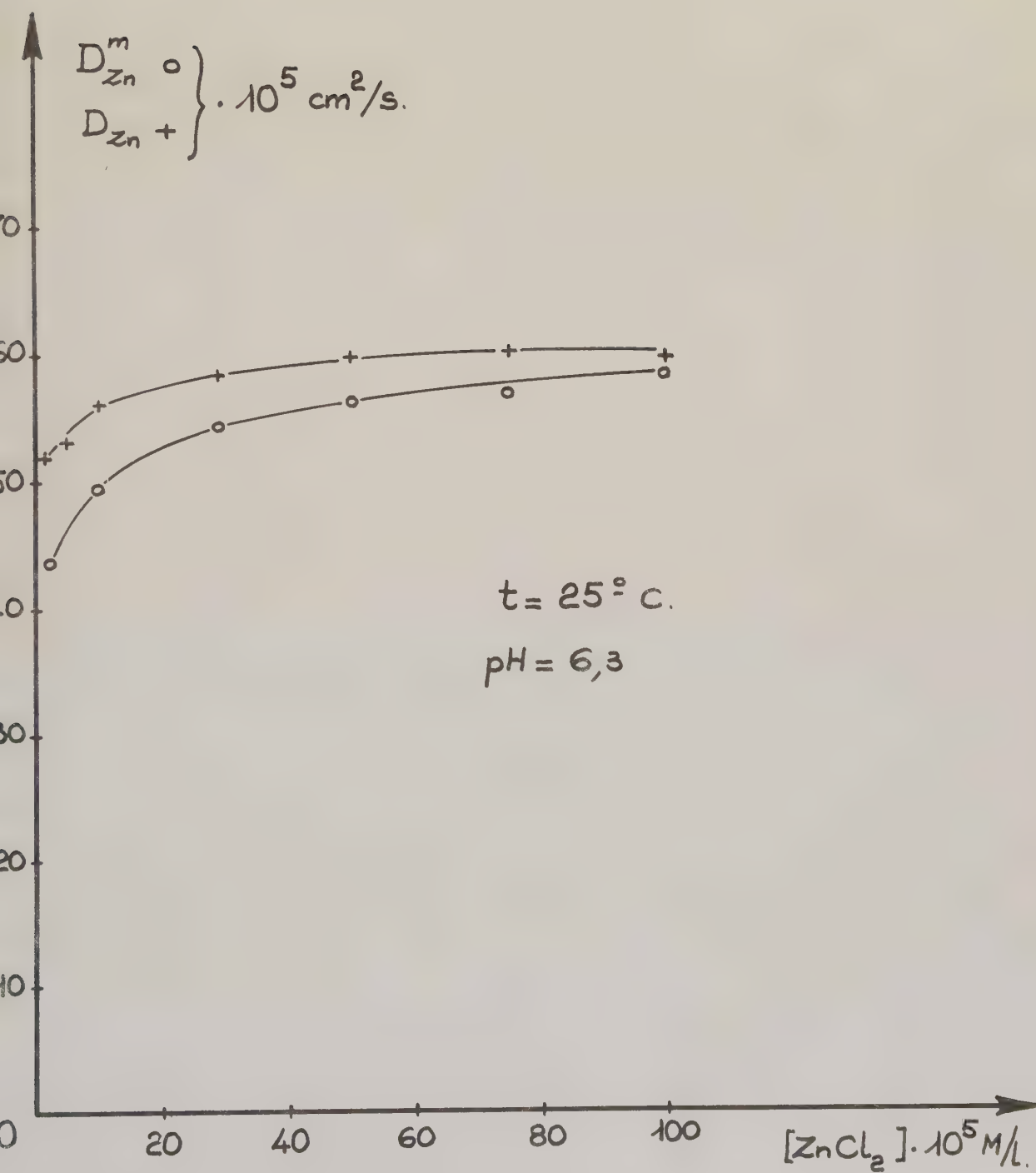


Fig. 11





Nous avons mesuré les viscosités des différentes solutions pour vérifier que l'abaissement du coefficient de self-diffusion de l'ion zinc en présence de protéine n'est pas dû à une augmentation de la viscosité des solutions protéiques (Tableau XIII).

--- TABLEAU XIII ---

| $(\text{ZnCl}_2) \times 10^5 \text{ M/l}$ | $\eta$ en cps | $\eta_{\text{SAH}}$ en cps | $\eta_{\text{SAH}}/\eta$ |
|-------------------------------------------|---------------|----------------------------|--------------------------|
| 4,05                                      | 0,926         | 0,930                      | 1,004                    |
| 20,25                                     | 0,928         | 0,934                      | 1,006                    |
| 25                                        | 0,929         | 0,935                      | 1,006                    |
| 40,5                                      | 0,930         | 0,936                      | 1,006                    |
| 50                                        | 0,931         | 0,937                      | 1,006                    |
| 81                                        | 0,934         | 0,939                      | 1,005                    |
| 100                                       | 0,936         | 0,940                      | 1,004                    |

c) - Milieu tampon acétate de sodium-acide acétique, pH = 7,4

Les mesures de  $D_{\text{Zn}}$  et  $D_{\text{Zn}}^m$  sont portées dans le tableau XIV. Les courbes représentant  $D_{\text{Zn}}$  et  $D_{\text{Zn}}^m$  en fonction de la concentration en chlorure de zinc sont représentées par la figure 12.

--- TABLEAU XIV ---

| $(\text{ZnCl}_2) \times 10^5 \text{ M/l}$ | $D_{\text{Zn}} \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$ | $D_{\text{Zn}}^m \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$ | $\bar{v}$ |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------|
| 1                                         | 0,52                                              | 0,18                                                | 0,74      |
| 5                                         | 0,54                                              | 0,24                                                | 3,1       |
| 10                                        | 0,57                                              | 0,27                                                | 5,8       |
| 50                                        | 0,60                                              | 0,52                                                | 7,3       |
| 100                                       | 0,60                                              | 0,56                                                | 7,3       |



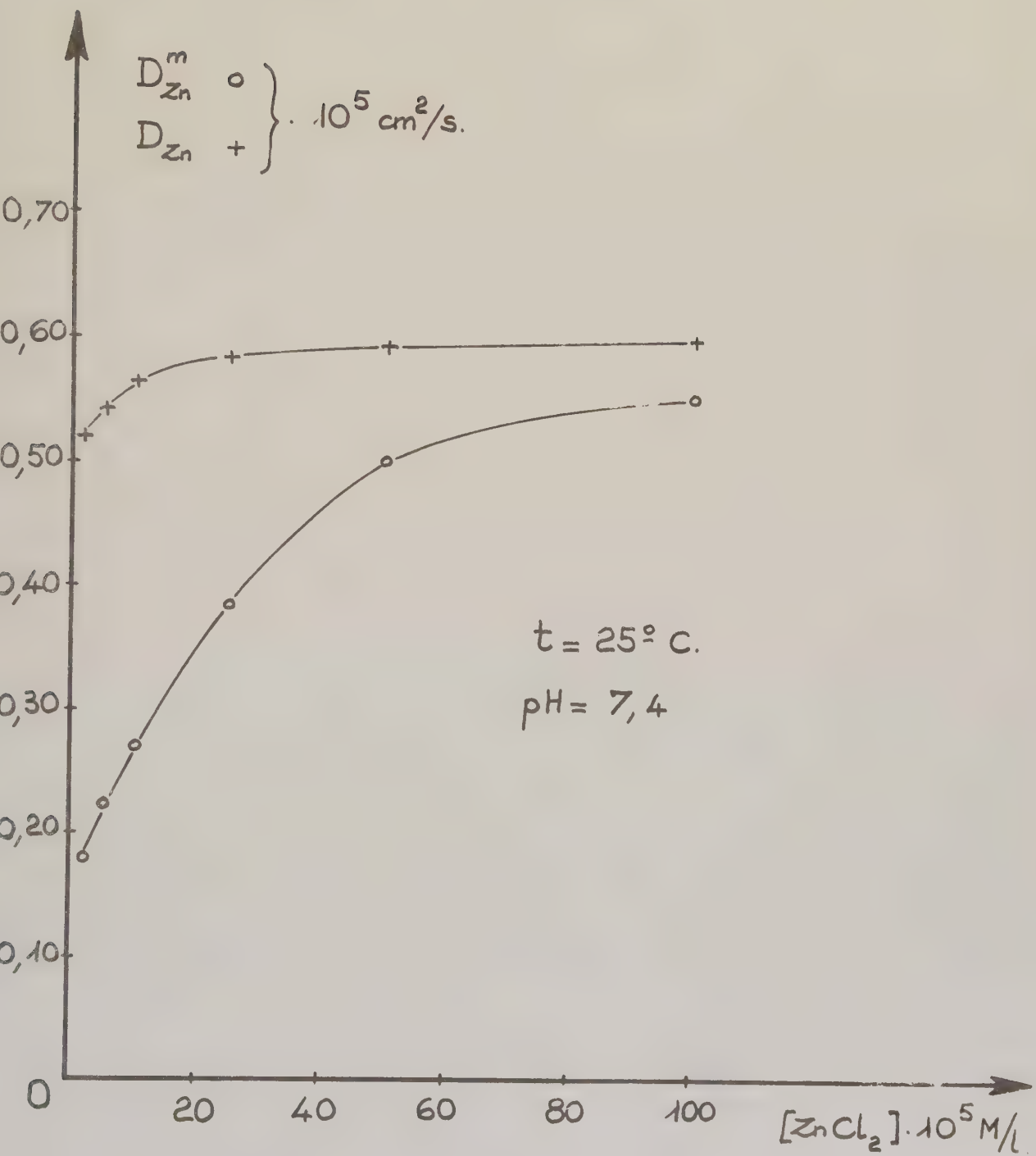


Fig. 12



Nous avons porté  $\bar{v}$  en fonction de la concentration en chlorure de zinc sur la figure 14. Il semble que l'on atteigne un palier; 7 ou 8 ions zinc se lient par molécule de Serum Albumine Humaine.

De même, nous avons fait les mesures de viscosité des différentes solutions (tableau XV).

--- TABLEAU XV ---

| $(\text{ZnCl}_2) \times 10^5 \text{M/l}$ | $\eta$ | $\eta_{\text{SAH}}$ | $\eta_{\text{SAH}}/\eta$ |
|------------------------------------------|--------|---------------------|--------------------------|
| 1                                        | 0,925  | 0,928               | 1,003                    |
| 20                                       | 0,924  | 0,926               | 1,002                    |
| 40                                       | 0,924  | 0,927               | 1,003                    |
| 50                                       | 0,926  | 0,927               | 1,001                    |
| 100                                      | 0,935  | 0,940               | 1,005                    |

d) - Milieu tampon véronal, pH = 8,6

Nous avons employé ce milieu tampon puisqu'il est utilisé par les immunologistes. Pour ces expériences, nous ne donnons qu'un tableau succinct, car, déjà en milieu véronal pur, le coefficient de self-diffusion de l'ion zinc est considérablement abaissé; on peut supposer qu'il y a un engagement entre l'ion zinc et les constituants du tampon. Cependant, en présence d'albumine, dans ce milieu réactionnel, on a une légère diminution du coefficient de self-diffusion de l'ion zinc et nous avons donc pu calculer approximativement le nombre d'ions zinc liés par molécule de S.A.H.

Les expériences n'ont pu être faites que pour deux concentrations différentes en chlorure de zinc. (Tableau XVI).



--- TABLEAU XVI ---

| $(\text{ZnCl}_2) \text{ M/l}$ | $D_{\text{Zn}} \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$ | $D_{\text{Zn}}^m \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$ | $\bar{v}$ |
|-------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------|
| $2 \cdot 10^{-4}$             | 0,400                                             | 0,360                                               | 2         |
| $10^{-3}$                     | 0,388                                             | 0,377                                               | 3         |

Nous pouvons remarquer que les valeurs de  $\bar{v}$  sont très faibles, et, si l'on tient compte de l'engagement des ions zinc avec les ions du tampon, la concentration en  $\text{Zn}^{++}$  susceptibles de participer à la liaison avec l'albumine est inférieure à la concentration en zinc totale.

D'après la formule (43), on voit donc que le nombre  $\bar{v}$  que nous avons calculé est supérieur au nombre réel d'ions zinc liés par molécule d'albumine. Cependant, l'effet du tampon intervient dans nos calculs puisque nous avons pris soin de mesurer  $D_{\text{Zn}}$  dans le milieu véronal. Cette mesure nous permet de mettre en évidence d'une façon spectaculaire les interactions entre les ions zinc et ce milieu tampon.

e) - Milieu acétate de sodium-acide acétique, pH = 7,1

Le tampon a une force ionique  $I/2 = 0,03$ ; nous avons ajouté le chlorure de zinc sans maintenir constante la force ionique. Nous obtenons des représentations de  $D_{\text{Zn}}$  et  $D_{\text{Zn}}^m$  en fonction de la concentration en chlorure de zinc analogues au cas d, (figure 13), mais il y a formation de complexes précipitants dès que la concentration en chlorure de zinc dépasse  $8,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ . L'accroissement de la force ionique s'accompagne, en effet, d'un abaissement du pouvoir précipitant de tous les métaux pour les protéines sériques (23).

Les résultats obtenus dans ce milieu sont portés dans le tableau XVII.





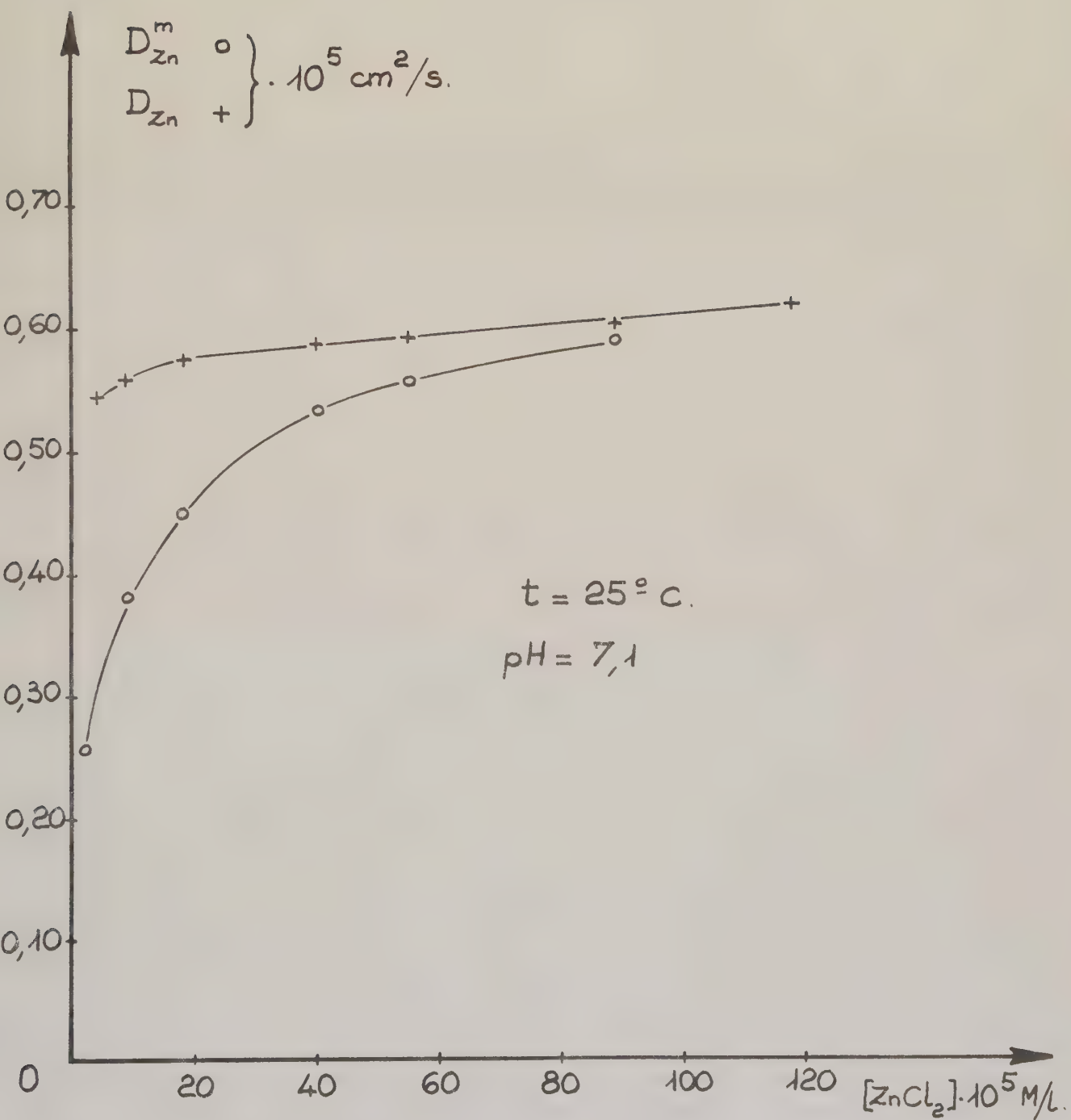


Fig. 13



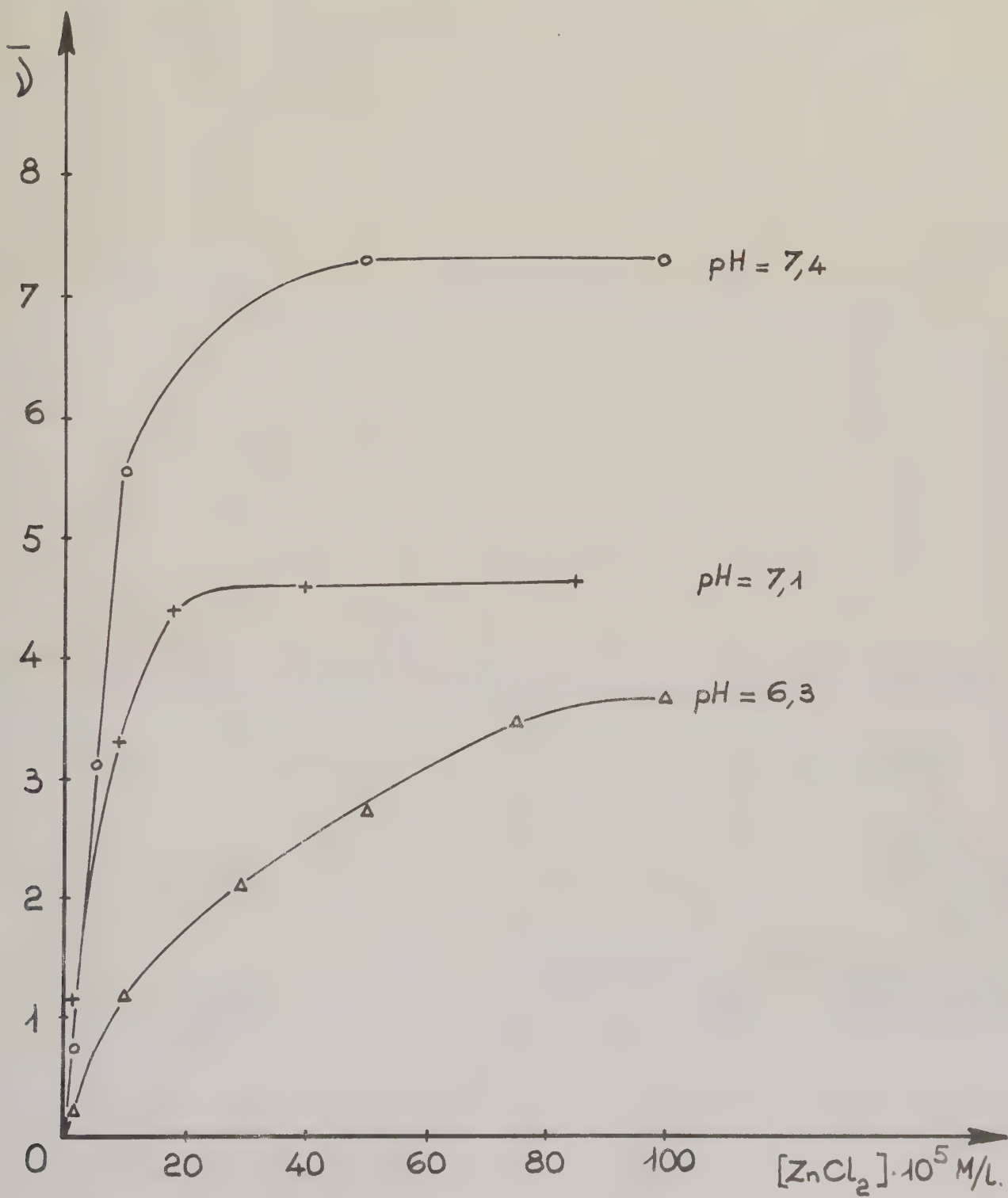


Fig. 14



--- TABLEAU XVII ---

| $(\text{ZnCl}_2) \times 10^5 \text{ M/l}$ | $D_{\text{Zn}} \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$ | $D_{\text{Zn}}^m \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$ | $\bar{v}$ |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------|
| 1,77                                      | 0,55                                              | 0,23                                                | 1,15      |
| 8,85                                      | 0,57                                              | 0,38                                                | 3,3       |
| 17,7                                      | 0,58                                              | 0,45                                                | 4,4       |
| 40                                        | 0,60                                              | 0,54                                                | 4,46      |
| 60                                        | 0,60                                              | 0,56                                                | 4,5       |
| 85                                        | 0,61                                              | 0,58                                                | 4,7       |

Nous avons également vérifié l'effet de viscosité pour la plupart de ces différentes solutions. (Tableau XVIII)

--- TABLEAU XVIII ---

| $(\text{ZnCl}_2) \times 10^5 \text{ M/l}$ | $\eta$ | $\eta_{\text{SAH}}$ | $\eta_{\text{SAH}}/\eta$ |
|-------------------------------------------|--------|---------------------|--------------------------|
| 1,77                                      | 0,905  | 0,913               | 1,008                    |
| 8,85                                      | 0,910  | 0,916               | 1,006                    |
| 17,7                                      | 0,912  | 0,921               | 1,009                    |
| 85                                        | 0,913  | 0,922               | 1,009                    |

Les rapports  $\eta_{\text{SAH}}/\eta$  sont trop proches de l'unité pour que l'on ait besoin de faire des corrections de viscosité sur les coefficients de self-diffusion de l'ion zinc dans les solutions protéiques.

Dans ce cas, nous avons également porté  $\bar{v}$  en fonction de la concentration en  $\text{ZnCl}_2$  et les résultats relatifs aux pH 6,3, 7,1 et 7,4 sont groupés sur la figure 14.

Cette représentation fait apparaître un palier qui caractérise le nombre d'ions liés par molécule d'albumine et qui varie en fonction du pH.



Il semble que la liaison ne commence à s'établir que pour un pH supérieur à 4, quelle que soit la concentration en  $\text{ZnCl}_2$ .

D'autre part, le nombre maximum d'ions liés semble se situer dans le domaine physiologique.

La représentation  $\bar{v} = f(\text{pH})$  (figure 15) met particulièrement bien en évidence ce dernier fait.

Enfin, le nombre d'ions liés par molécule d'albumine est relativement faible, ce qui suggère que le nombre de sites liants doit être faible, lui aussi.

## 2 - Etude des interactions entre l'albumine et l'ion zinc à 37°C

Cette étude a été précédée de la mesure des coefficients de self-diffusion de l'albumine dans le milieu tampon envisagé. (Chapitre V - tableau XI).

### a) - Milieu acétate de sodium - acide acétique, pH = 4

Les résultats expérimentaux sont portés sur la figure 16.  $D_{\text{Zn}}$  et  $D_{\text{Zn}}^m$  sont identiques quelle que soit la concentration en chlorure de zinc dans le tampon. De même qu'à 25°C, on peut dire qu'à 37°C il n'y a pas interaction entre l'albumine et les ions zinc.

Par contre, en mesurant les viscosités de quelques unes de ces solutions, nous avons observé que la viscosité des solutions protéiques est légèrement plus faible que celle des solutions ne contenant pas d'albumine (Tableau XIX).

--- TABLEAU XIX ---

| $(\text{ZnCl}_2) \times 10^5 \text{ M/l}$ | $\eta$ | $\eta_{\text{SAH}}$ | $\eta_{\text{SAH}}/\eta$ |
|-------------------------------------------|--------|---------------------|--------------------------|
| 4,05                                      | 0,763  | 0,753               | 0,987                    |
| 20,25                                     | 0,765  | 0,761               | 0,995                    |
| 80,0                                      | 0,769  | 0,763               | 0,992                    |





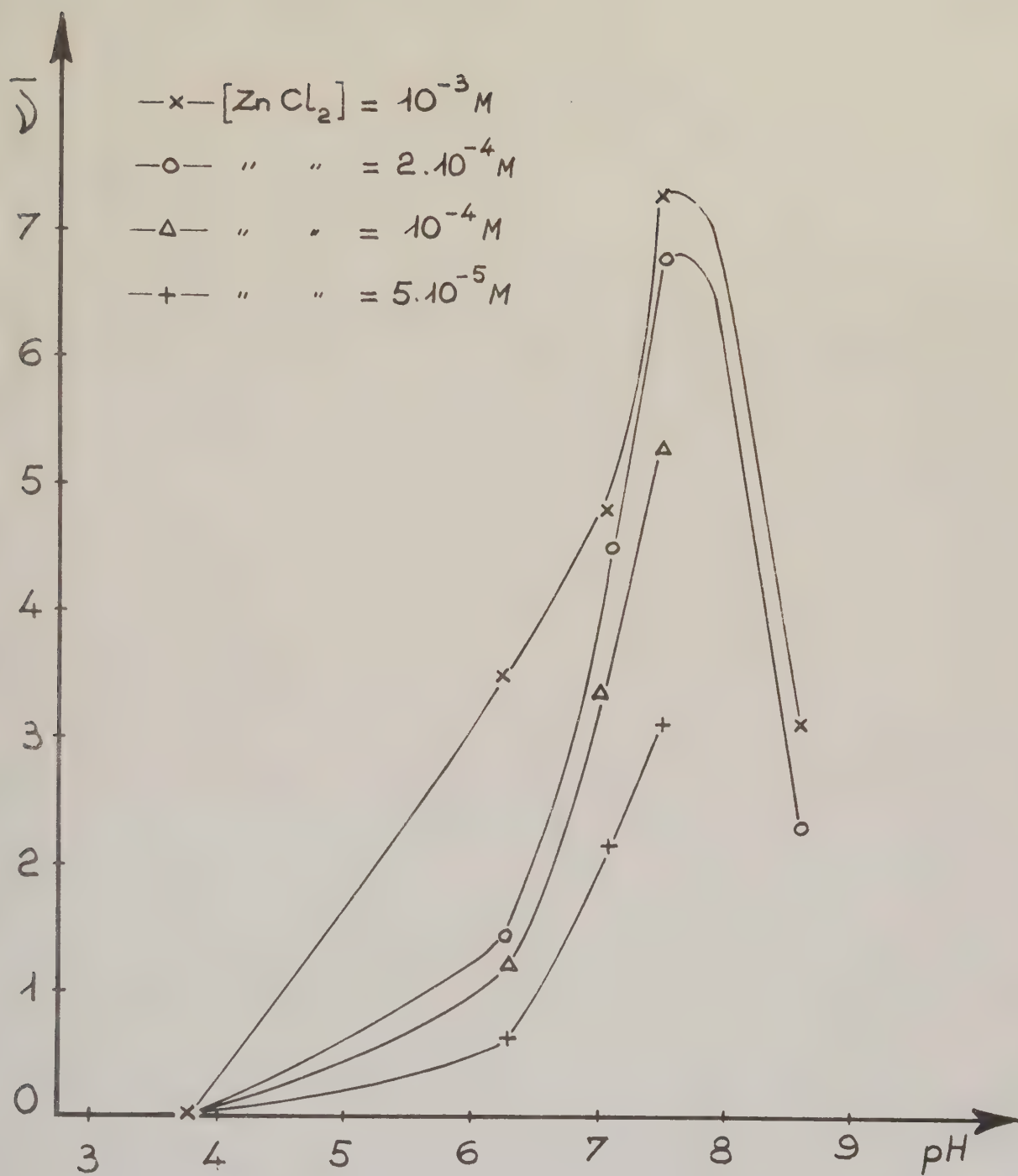


Fig. 15



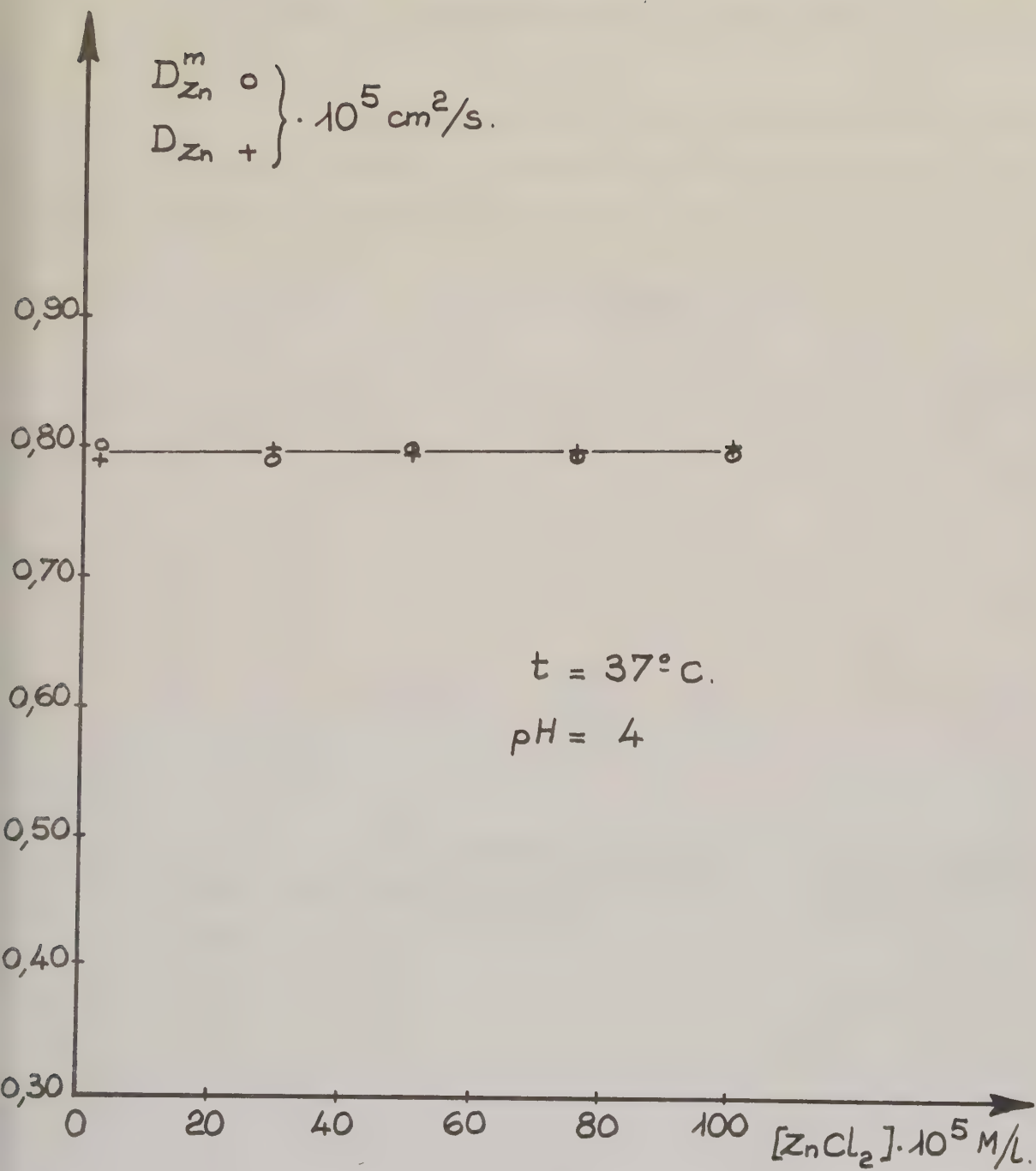


Fig. 16



b) - Milieu acétate de sodium-acide acétique, pH = 6

Nous avons porté dans le tableau XX les mesures de  $D_{Zn}^m$  et  $D_{Zn}$  pour différentes concentrations en chlorure de zinc et calculé le nombre d'ions moyens,  $\bar{v}$ , liés par molécule d'albumine pour chaque concentration envisagée.

Les variations de  $D_{Zn}^m$  et  $D_{Zn}$  sont représentées sur la figure 17 et on peut remarquer l'abaissement déjà spectaculaire de  $D_{Zn}^m$  par rapport à  $D_{Zn}$ , bien que le pH soit encore acide.

--- TABLEAU XX ---

| $(ZnCl_2) \times 10^5 M/l$ | $D_{Zn} \times 10^5 cm^2/s$ | $D_{Zn}^m \times 10^5 cm^2/s$ | $\bar{v}$ |
|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------|
| 3,25                       | 0,82                        | 0,61                          | 0,94      |
| 16,26                      | 0,82                        | 0,67                          | 3,6       |
| 32,5                       | 0,82                        | 0,72                          | 4,5       |
| 65,04                      | 0,82                        | 0,76                          | 5,4       |
| 80                         | 0,82                        | 0,77                          | 5,4       |
| 100                        | 0,82                        | 0,78                          | 5,5       |

Les viscosités des solutions protéiques paraissent plus faibles que celles des solutions ne contenant pas de protéine (Tableau XXI)



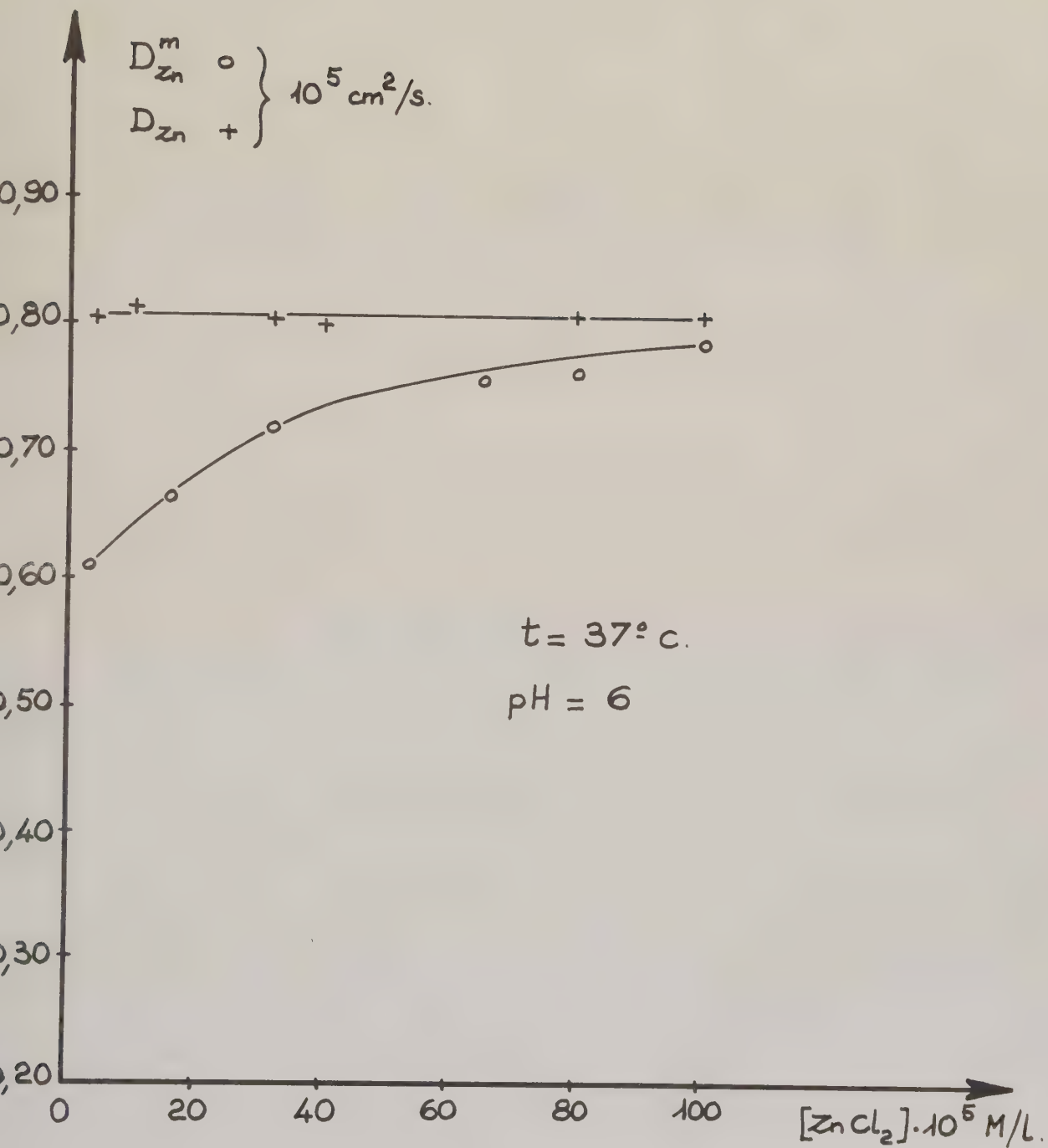


Fig. 17





--- TABLEAU XXI ---

| $(\text{ZnCl}_2) \times 10^5 \text{ M/l}$ | $\eta \text{ cps}$ | $\eta_{\text{SAH}} \text{ cps}$ | $\eta_{\text{SAH}} / \eta$ |
|-------------------------------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------|
| 20                                        | 0,728              | 0,717                           | 0,985                      |
| 25                                        | 0,728              | 0,720                           | 0,989                      |
| 40                                        | 0,729              | 0,722                           | 0,990                      |
| 80                                        | 0,746              | 0,729                           | 0,977                      |
| 100                                       | 0,749              | 0,728                           | 0,971                      |

Pour les solutions de  $\text{pH} = 6$ , on observe donc le même effet que pour les solutions de  $\text{pH} = 4$ . Le rapport  $\eta_{\text{SAH}}/\eta$  est à peu près constant et égal à 0,98.

Si on porte  $\bar{V}$  en fonction de la concentration en chlorure de zinc, figure 19, on atteint un palier de 5 ou 6 ions zinc liés par molécule de protéine, même à  $\text{pH} = 6$ .

Le nombre d'ions zinc liés est donc beaucoup plus important pour  $\text{pH} = 6$  que pour  $\text{pH} = 6,3$  quand la température augmente de  $25^\circ\text{C}$  à  $37^\circ\text{C}$ .

c) - Milieu acétate de sodium-acide acétique,  $\text{pH} = 7,4$

Le coefficient de self-diffusion du zinc,  $D_{\text{Zn}}$  est toujours constant,  $D_{\text{Zn}} = 0,82 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ . En présence de protéine l'abaissement du coefficient de self-diffusion du zinc est très spectaculaire. Nous avons porté dans le tableau XXII les résultats obtenus.



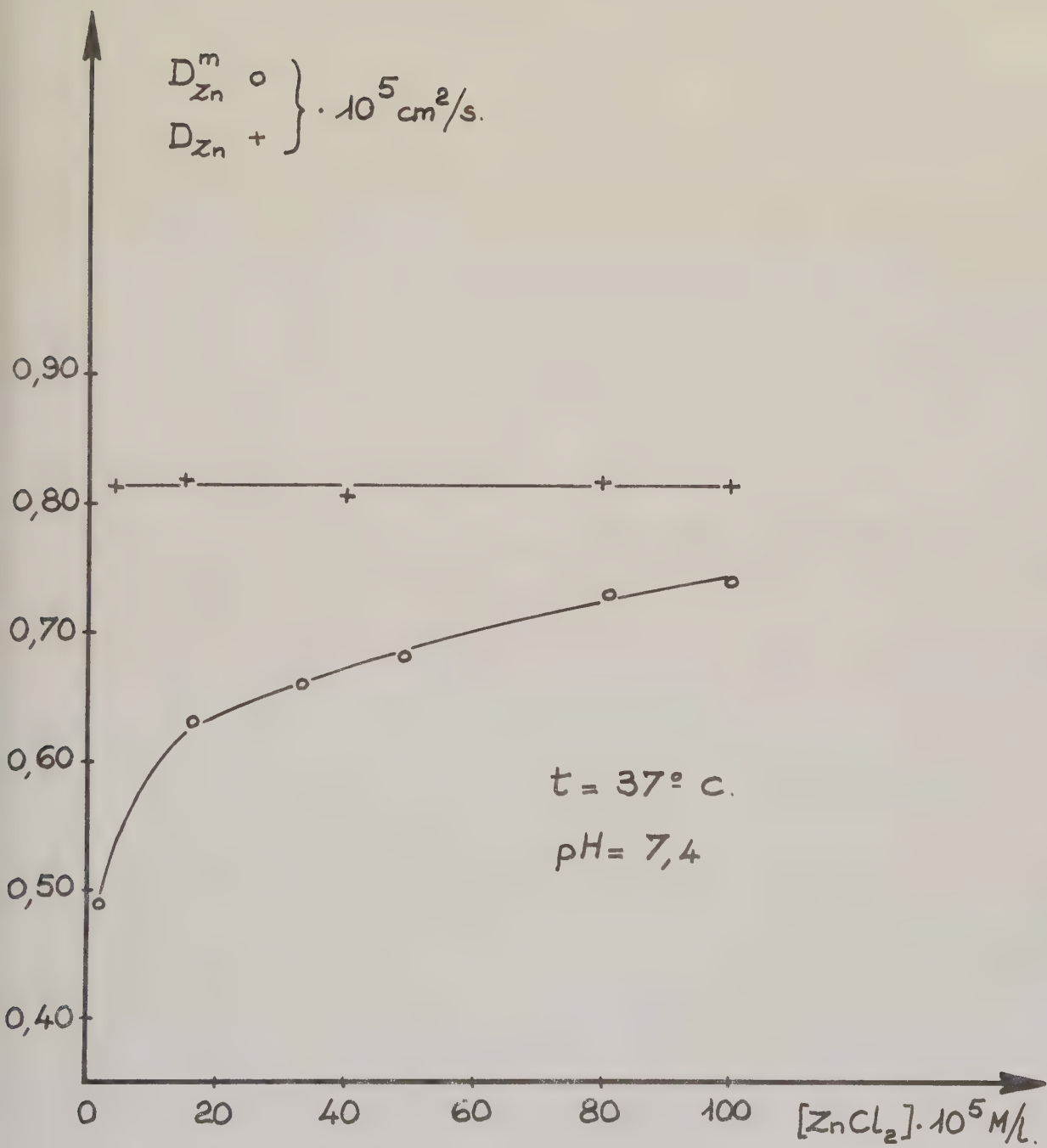


Fig. 18



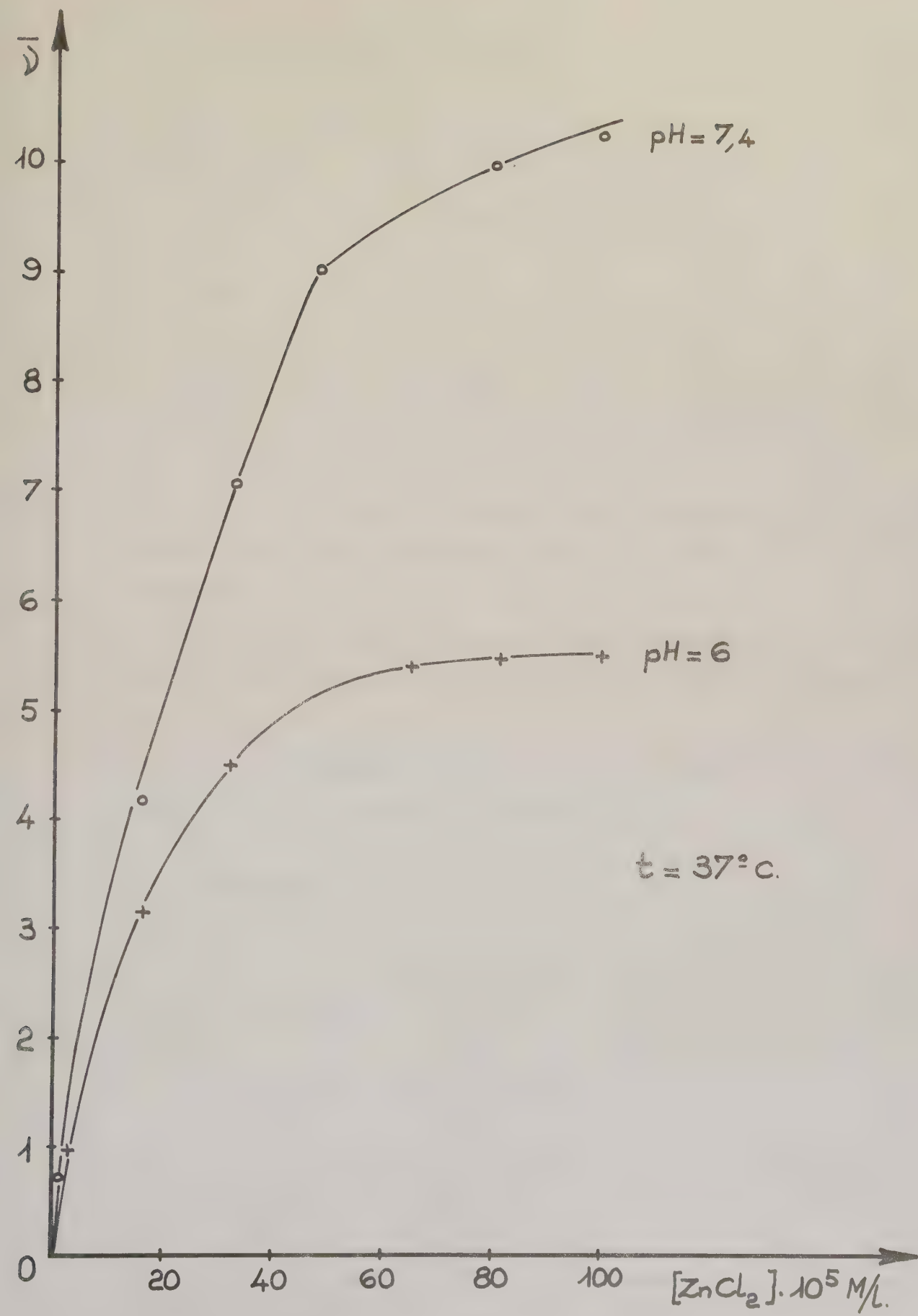


Fig. 19



--- TABLEAU XXII ---

| $(\text{ZnCl}_2) \times 10^5 \text{ M/l}$ | $D_{\text{Zn}} \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$ | $D_{\text{Zn}}^m \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$ | $\bar{v}$ |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------|
| 1,63                                      | 0,82                                              | 0,49                                                | 0,74      |
| 16,3                                      | 0,82                                              | 0,63                                                | 4,2       |
| 32,56                                     | 0,82                                              | 0,66                                                | 7,1       |
| 48                                        | 0,82                                              | 0,68                                                | 9,1       |
| 81,40                                     | 0,82                                              | 0,73                                                | 10,0      |
| 100                                       | 0,82                                              | 0,74                                                | 10,5      |

La figure 18 représente les variations de  $D_{\text{Zn}}$  et  $D_{\text{Zn}}^m$  en fonction de la concentration en chlorure de zinc pour le pH = 7,4 et la température 37°C.

La figure 19 rassemble les résultats du calcul de  $\bar{v}$  pour le pH = 7,4 et le pH = 6 en fonction de la concentration en chlorure de zinc.

Il semble que pour pH = 7,4, on atteigne un palier de 11 ions zinc liés par molécule de protéine.

### III - DISCUSSION

La mesure des coefficients de self-diffusion de l'ion  $\text{Zn}^{++}$ , en milieu tampon, en présence de protéine, permet de calculer le nombre approximatif d'ions liés par molécule de Serum Albumine Humaine.

#### I - Influence de la viscosité

L'abaissement du coefficient de self-diffusion de l'ion zinc n'est pas dû, en partie, à une viscosité supérieure des solutions protéiques par rapport aux solutions salines.

On trouve qu'à 25°C, pour l'ensemble des solutions étudiées, à différents pH, le rapport  $\eta_{\text{SAH}}/\eta$  de la viscosité d'une solution protéi-





nique à celle d'une solution ne contenant pas de protéine, mais identique par ailleurs, est de l'ordre de 1,005. Pratiquement les légères variations de viscosité n'interviennent pas dans l'abaissement de  $D_{Zn}^m$  par rapport à  $D_{Zn}^*$ .

Par contre, à 37°C, non seulement la viscosité n'influe pas, mais nous avons trouvé que la viscosité des solutions protéiniques est légèrement plus faible que celle des solutions salines. En moyenne,  $\eta_{SAH}/\eta = 0,97$ .

Il nous a donc paru intéressant, pour les températures de 25°C et 37°C, de mesurer simplement les viscosités de deux solutions aqueuses de Serum Albumine Humaine ainsi que les coefficients de self-diffusion de l'eau dans ces différentes solutions.

Nous avons obtenu des résultats cohérents avec l'effet de viscosité signalé ci-dessus.

$\alpha - A \ 25^{\circ}C$   
.....

Pour une concentration en albumine, (S.A.H.) =  $10^{-5}M$

$$\rho = 0,99827 \text{ g/cm}^3 \quad \eta = 0,896 \text{ cps}$$

$$D_{H_2O} = 2,15 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Pour une concentration en albumine, (S.A.H.) =  $3 \cdot 10^{-5}M$

$$\rho = 0,99860 \text{ g/cm}^3 \quad \eta = 0,897 \text{ cps}$$

$$D_{H_2O} = 2,15 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Rappelons que  $\rho_{\text{eau}} = 0,99707 \text{ g/cm}^3$   $\eta_{\text{eau}} = 0,8937 \text{ cps}$

$$D_{H_2O} = 2,25 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

A 25°C les résultats sont donc parfaitement cohérents, le coefficient de self-diffusion de l'eau dans les solutions d'albumine est plus faible que le coefficient de self-diffusion de l'eau pure. Les viscosités des solutions d'albumine sont plus grandes que celles de l'eau pure.



b - A 37°C.

Pour une concentration en albumine, (S.A.H.) =  $10^{-5}M$

$$\rho = 0,9944 \text{ g/cm}^3 \quad \eta = 0,698 \text{ cps}$$

$$D_{H_2O} = 2,94 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Pour une concentration en albumine, S.A.H. =  $3 \cdot 10^{-5}M$

$$\rho = 0,9949 \text{ g/cm}^3 \quad \eta = 0,699 \text{ cps}$$

$$D_{H_2O} = 2,92 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Dans l'eau pure, on a les résultats suivants :

$$\rho_{\text{eau}} = 0,9935 \text{ g/cm}^3 \quad \eta = 0,7016 \text{ cps}$$

$$D_{H_2O} = 2,82 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Le coefficient de self-diffusion de l'eau dans les solutions contenant de l'albumine est donc plus élevé que dans l'eau pure. On retrouve le même effet de viscosité que pour toutes les solutions que nous avons étudiées.

Nous ne savons pas expliquer ce phénomène; il sera certainement intéressant de faire une étude systématique du coefficient de self-diffusion de l'eau en présence de diverses protéines et dans un domaine de température plus important. Il se peut que l'on ait une certaine déstructuration de l'eau par les macromolécules à 37°C; c'est une hypothèse que nous avançons avec prudence car nous n'avons pas trouvé d'études analogues dans la littérature.

## 2 - Influence du tampon

### a) - Influence du tampon sur l'ion zinc.

Il paraît évident que les ions composant le milieu tampon influent sur les interactions entre l'albumine et l'ion zinc. En effet, la mesure



des coefficients de self-diffusion de l'ion zinc dans le milieu acétate de sodium-acide acétique, pour différents pH, en variant la concentration en chlorure de zinc le montre clairement.

Le coefficient de self-diffusion de l'ion zinc dans une solution chlorhydrique 0,1 M et pour une concentration  $10^{-3}$  M en chlorure de zinc est  $D = 0,73 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  (résultat analogue à ceux de WANG<sup>(93)</sup> et MARCINKOWSKY<sup>(94)</sup>).

En présence de tampon, il y a une diminution de ce coefficient puisque  $D_{\text{Zn}}$  est à peu près constant et égal à  $0,6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ .

L'ion zinc n'existe donc pas en totalité à l'état  $\text{Zn}^{++}$  dans le milieu considéré. Suivant KLOTZ et FIESS<sup>(95)</sup> (référence citée par LAL<sup>(59)</sup>), les ions métalliques existent en partie sous la forme  $\text{ZnAc}^+$ , complexe qui participe à la liaison.

Nous pouvons cependant tenir compte de cette interaction, puisque le coefficient de self-diffusion qui intervient dans l'équation (43) est le coefficient de self-diffusion de l'ion zinc dans le tampon.

Par contre, il est à peu près certain que la concentration en ions zinc susceptibles de participer à la liaison n'est pas connue avec précision.

#### *b) - Influence du tampon sur l'albumine*

Il est intéressant d'appliquer la méthode des coefficients de self-diffusion aux interactions entre l'albumine et les ions composant le tampon.

Nous avons donc mesuré les coefficients de self-diffusion de l'ion acétate,  $\text{D}_{\text{CH}_3\text{COO}^-}$ , marqué au  $\text{C}^{14}$  et de l'ion sodium,  $\text{D}_{\text{Na}^+}$ , marqué au  $\text{Na}^{22}$ , en absence et en présence d'albumine.

La concentration en albumine est  $1,41 \times 10^{-4} \text{ M/l}$  (1 % en poids).



Les résultats expérimentaux sont groupés dans les tableaux XXIII et XXIV. Le pH est fixé à pH = 6,3.

--- TABLEAU XXIII ---

| (S.A.H.)<br>en % poids | (tampon)<br>en M/l | $\eta$ en cps | $D_{CH_3COO^-} \times 10^5 \text{ cm}^2/s$ | $D_{CH_3COO^-} \times 10^5 \text{ cm}^2/s$<br>corrigé |
|------------------------|--------------------|---------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 0                      | $10^{-1}$          | 0,925         | 1,01                                       | 1,01                                                  |
| 0                      | $10^{-3}$          | 0,909         | 1,01                                       | 1,01                                                  |
| 1 %                    | $10^{-1}$          | 0,982         | 0,98                                       | 1,04                                                  |
| 1 %                    | $10^{-3}$          | 0,977         | 0,36                                       | 0,38                                                  |

--- TABLEAU XXIV ---

| (S.A.H. )<br>en % poids | (tampon)<br>en M/l | $\eta$ en cps | $D_{Na} \times 10^5 \text{ cm}^2/s$ | $D_{Na} \times 10^5 \text{ cm}^2/s$<br>corrigé |
|-------------------------|--------------------|---------------|-------------------------------------|------------------------------------------------|
| 0                       | $10^{-1}$          | 0,925         | 1,15                                | 1,15                                           |
| 0                       | $10^{-3}$          | 0,909         | 1,17                                | 1,17                                           |
| 1 %                     | $10^{-1}$          | 0,982         | 1,03                                | 1,10                                           |
| 1 %                     | $10^{-3}$          | 0,977         | 1,11                                | 1,18                                           |

Nous avons appelé  $D_{\text{corrigé}}$  les coefficients de self-diffusion des ions acétate et sodium obtenus en multipliant les coefficients de self-diffusion mesurés par le rapport des viscosités  $\eta_{\text{SAH}}/\eta$ . Cet effet n'est pas négligeable car la concentration des solutions d'albumine est de l'ordre de  $10^{-4} \text{ M}$  ce qui entraîne une augmentation de la viscosité du milieu.





Les résultats obtenus montrent clairement que :

1°) - l'ion acétate se lie à l'albumine,  $D_{\text{CH}_3\text{COO}^-}$  a la valeur  $1,01 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  dans les solutions salines, cette valeur devient  $0,38 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  en présence d'albumine 1 %. Il y a donc engagement.

On peut calculer le nombre d'ions liés par molécule d'albumine.

$$\bar{v} = \frac{D_{\text{CH}_3\text{COO}^-} - D_{\text{CH}_3\text{COO}^-}^m}{D_{\text{CH}_3\text{COO}^-} - D_{\text{S.A.H.}}} \times \frac{(\text{CH}_3\text{COO}^-)}{(\text{S.A.H.})} \quad (14)$$

$$\bar{v} \approx 5$$

Pour une concentration  $10^{-1} \text{ M}$  en  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , il existe trop d'ions libres en solution pour pouvoir déterminer le nombre d'ions se liant à l'albumine :  $D_{\text{CH}_3\text{COO}^-}$  et  $D_{\text{CH}_3\text{COO}^-}^m$  sont alors identiques et il est dommage

que nous ne puissions connaître l'interaction entre les ions acétate et l'albumine à cette concentration qui est celle de nos milieux tampon.

2°) - Si l'on corrige de l'effet de viscosité les coefficients de self-diffusion des ions sodium en présence de protéine, on retrouve, aux erreurs expérimentales près, le coefficient de l'ion sodium dans le tampon seul. Même pour une concentration de  $10^{-3} \text{ M}$  en ions sodium, la méthode montre qu'il n'y a pas interaction entre  $\text{Na}^+$  et S.A.H.

Dans une publication récente (96) les auteurs ont mesuré le coefficient de self-diffusion de l'ion sodium par la méthode du capillaire, en présence d'albumine de boeuf.

Ils ont trouvé que le coefficient de self-diffusion du sodium  $D_{\text{Na}} = 1,11 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  en présence d'albumine, mais ils n'ont pas mesuré la viscosité des solutions protéiques qu'ils ont étudiées. Or, il ne faut pas



conclure qu'il y a interaction sans avoir vérifié tous les facteurs pouvant intervenir sur le coefficient de self-diffusion des ions considérés.

Pour être plus sûrs de nos résultats, nous avons mesuré le coefficient de self-diffusion de l'ion sodium en présence et en absence d'albumine, de concentration pondérale 1 %, dans une solution de soude,  $(\text{NaOH}) = 10^{-3} \text{ M}$ .

--- TABLEAU XXV ---

| (S.A.H.)<br>en poids | (NaOH)<br>en M/l | $\eta_{\text{SAH}}/\eta$ | $D_{\text{Na}} \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$ | $D_{\text{Na}} \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$<br>corrigé |
|----------------------|------------------|--------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 0                    | $10^{-3}$        | 1                        | 1,12                                              | 1,12                                                         |
| 1 %                  | $10^{-3}$        | 1,0562                   | 1,07                                              | 1,13                                                         |

Même dans ce cas où le pH est franchement basique, il n'y a pas interaction entre les ions  $\text{Na}^+$  et S.A.H.

Généralement, les auteurs ayant étudié les interactions entre les ions sodium et l'albumine ont montré qu'il n'y avait pas de liaison.

Seuls, DOREHUS<sup>(78)</sup> et CASTLEDEN<sup>(96)</sup> sont d'un avis contraire.

Nous pensons avoir montré qu'il n'y a pas interaction, car la méthode des coefficients de self-diffusion est particulièrement sensible pour tester s'il y a ou non liaison entre les ions et des macromolécules.

### 3 - Nombre de sites liants

#### a) - Rappel théorique

Dans le cas des interactions zinc - Serum Albumine Humaine, on peut considérer qu'il se forme des complexes que l'on peut décrire par la loi d'action de masse, le complexe lui-même est caractérisé par des constantes



d'association définies. Ce sujet a été exposé en détails par plusieurs auteurs (18-19-23-97).

L'association d'une macromolécule P et d'une molécule plus petite ou d'un ion A peut être décrite par n constantes d'association.

$$k_1 = \frac{(PA)}{(P)(C)} \quad k_2 = \frac{(PA_2)}{(PA)(C)} \quad \dots \quad k_n = \frac{(PA_n)}{(PA_{n-1})(C)} \quad (45)$$

(C) est la concentration en A libre

n le nombre de sites liants

Il faut remarquer que  $k_1, k_2 \dots k_n$  ne sont pas des constantes vraies mais dépendent du solvant, de la concentration en sel, comme toutes les constantes d'équilibre qui sont exprimées en fonction des concentrations et non des activités.

Pour obtenir les constantes thermodynamiques, exprimées en fonction des activités des espèces liantes, il faut extrapoler à dilution infinie de tous les solutés. Pratiquement on ne peut déterminer les constantes d'équilibre thermodynamiques à cause du peu de précision des données expérimentales. D'ailleurs il est impossible de déterminer expérimentalement  $(PA), (PA_2) \dots (PA_n)$ , seul le nombre moyen,  $\bar{v}$ , d'ions ou de petites molécules associés à chaque macromolécule peut être atteint.

$$\bar{v} = \frac{\text{nombre de molécules ou ions combinés A}}{\text{nombre total de molécules P}} \quad (46)$$

Il est possible d'exprimer  $\bar{v}$  en fonction des n constantes d'association  $k_1, k_2 \dots k_n$ .

En effet, le nombre total (par litre de solution) de moles de l'espèce macromoléculaire est :

$$(P) + (PA) + (PA_2) \dots + (PA_n)$$



et le nombre total de moles de A combinées (par litre de solvant) est :

$$(PA) + 2 (PA_2) + \dots + n (PA_n)$$

or  $(PA) = k_1 (C) (P)$

$$(PA_2) = k_2 (C) (PA_1) = k_1 k_2 (C)^2 (P)$$

$$(PA_n) = k_n (C) \cdot (PA_{n-1}) = k_1 k_2 \dots k_n (C)^n (P)$$

$$\frac{\overline{v}}{v} = \frac{k_1 (C) + 2k_1 k_2 (C)^2 + \dots + n k_1 k_2 \dots k_n (C)^n}{1 + k_1 (C) + k_1 k_2 (C)^2 + \dots + k_1 k_2 \dots k_n (C)^n} \quad (47)$$

α) Sites identiques et complètement indépendants

Supposons le cas le plus simple où les n sites liants sont identiques et où la fixation de A sur un point de la protéine n'affecte pas la fixation de A sur d'autres points de la macromolécule.

Supposons que les n sites identiques de la macromolécule P puissent être marqués de telle sorte qu'on les distingue.

Il y aura alors :

n formes différentes pour les espèces PA

$n(n-1)/2$  ! pour les espèces  $PA_2$

et, en général,  $\frac{n!}{i! (n-i)!}$  formes différentes pour les espèces  $PA_i$ .

Les formes P et  $PA_n$  sont uniques.

Si  $PA^*$  représente une espèce particulière de PA, c'est-à-dire une espèce où A est lié à un site particulier, la constante d'association

$\frac{(PA^*)}{(P)(C)}$  a, puisque les sites sont identiques, la même valeur k pour chaque

espèce.





Il y a  $n$  formes également probables de  $PA$ , une seule forme pour  $P$ , la première constante d'association de la réaction



est la somme de toutes les constantes  $\frac{(PA^*)}{(P) (C)}$ , elle est donc égale à  $nk$ .

On applique le même raisonnement à la suite des équilibres précédemment décrits.

Il y a  $n(n-1)/2!$  formes possibles pour  $PA_2$  et on a vu que

$$k_1 k_2 = \frac{(PA_2)}{(P) (C)^2} \cdot k_1$$

$$k_1 k_2 = \frac{n(n-1)}{2!} k^2 \quad \text{soit} \quad k_2 = \frac{n-1}{2} k$$

L'expression générale de  $k_i$  est :

$$k_i = k \frac{n-i+1}{i} \quad (48)$$

En portant cette valeur dans l'expression de  $\bar{v}$  on a :

$$\bar{v} = \frac{\sum_{i=1}^n i \left\{ \prod_{j=1}^i \left( \frac{n-j+1}{j} \right) \right\} k^i (C)^i}{1 + \sum_{i=1}^n \left\{ \prod_{j=1}^i \left( \frac{n-j+1}{j} \right) \right\} k^i (C)^i} \quad (49)$$

$$\text{or} \quad \prod_{j=1}^i \left( \frac{n-j+1}{j} \right) = \frac{n!}{(n-i)!i!} \quad (50)$$



De telle sorte que l'équation (49) devient :

$$\bar{v} = \frac{\sum_{i=1}^n i \frac{n!}{(n-i)!i!} k^i (c)^i}{1 + \sum_{i=1}^n \frac{n!}{(n-i)!i!} k^i (c)^i} \quad (51)$$

$$\text{Comme } (1 + kC)^n = 1 + \sum_{i=1}^n \frac{n!}{(n-i)!i!} (k(c))^i \quad (52)$$

suivant le théorème du binôme, la différentiation par rapport à  $kC$  conduit à :

$$kC \frac{d(1 + kC)^n}{d(kC)} = n kC (1 + kC)^{n-1} = \sum_{i=1}^n i \frac{n!}{(n-i)!i!} (kC)^i \quad (53)$$

L'équation (53) est égale au numérateur de l'équation (51), et l'équation (52) au dénominateur de l'équation (51) de telle sorte que l'on peut écrire l'équation (51) sous la forme :

$$\bar{v} = \frac{n k C (1 + kC)^{n-1}}{(1 + kC)^n} = \frac{n k C}{1 + k C} \quad (54)$$

$$\text{ou bien} \quad \frac{\bar{v}}{n - \bar{v}} = k C \quad (55)$$

On peut retrouver l'équation (55) plus simplement. La constante  $k$  que nous avons déjà définie est la constante d'équilibre de la réaction entre la substance A et un seul site liant de la macromolécule. Pour chaque site, l'état d'équilibre peut être représenté par son degré d'association  $\theta$ . Pour un site donné,  $\theta$  est la probabilité pour que la substance A soit liée sur ce site. En d'autres termes,  $\theta$  représente la fraction de sites sur différentes molécules qui sont liés à A. La fraction de sites n'ayant pas réagi



avec A est alors  $1 - \theta$  et la condition d'équilibre devient :

$$\frac{\theta}{1 - \theta} = k C \quad (56)$$

S'il y a maintenant  $n$  sites sur une macromolécule, sites identiques et complètement indépendants, le degré d'association doit être le même pour chaque site et, de plus, il doit avoir la même valeur que si la macromolécule ne possédait qu'un seul site réactif. Il en résulte que  $\bar{v} = n\theta$  et l'équation (56) donne immédiatement l'équation (55).

L'avantage de l'équation (55) est de représenter les équilibres multiples par une seule constante d'association  $k$ . Cependant, l'hypothèse que les sites liants sont identiques et indépendants n'est généralement pas applicable, mais on garde la forme simple de l'équation (55) pour analyser les données expérimentales.

### B) - Sites identiques non indépendants

Supposons qu'une macromolécule possède  $n$  sites identiques qui réagissent les uns sur les autres de telle sorte que la liaison de chaque site et d'une substance A affecte l'affinité de liaison des autres sites.

Il faut alors définir une nouvelle constante d'association, appelée constante d'association intrinsèque  $k_{int}$  qui sera la valeur limite de  $k$  pour  $\bar{v} = 0$ , c'est-à-dire avant qu'aucune interaction entre les sites due à la liaison ne soit intervenue.

$$k = k_{int} e^{-\phi(\bar{v})} \quad (57)$$

Si  $\phi(\bar{v})$  est une fonction croissante de  $\bar{v}$ , l'occupation de quelques sites rend la liaison entre A et les autres sites plus difficile; si c'est une fonction décroissante de  $\bar{v}$ , il y a interaction coopérative entre les sites, l'occupation de quelques sites favorise la liaison entre A et les autres. Par définition  $\phi(\bar{v}) = 0$  si  $\bar{v} = 0$ .



On doit remarquer que des sites réagissants identiques ne peuvent le rester quand intervient la liaison, les sites situés le plus près d'un site ayant réagi seront soumis à une interaction plus grande que ceux situés loin du site réagissant. Donc,  $\phi(\bar{v})$  est une moyenne.

$$\frac{\bar{v}}{n - \bar{v}} = k C = k_{int} e^{-\phi(\bar{v})} C \quad (58)$$

Si  $n$  est connu on peut appliquer directement la relation (58) pour déterminer l'interaction entre les sites.

### γ) - Sites non identiques

Supposons que la macromolécule possède  $m$  groupes d'emplacements différents, chaque groupe étant caractérisé par une constante d'association  $k_i$  et possédant un nombre  $n_i$  d'emplacements identiques et indépendants. Le nombre moyen  $\bar{v}$  de molécules de A fixées par la protéine est la somme de  $m$  termes, chacun représentant un groupe de  $n_i$  emplacements identiques et indépendants.

$$\bar{v} = \sum_{i=1}^{i=m} \frac{n_i k_i C}{1 + k_i C} \quad (59)$$

S'il y a interaction entre les sites,  $\bar{v}$  est donné par l'expression suivante :

$$\bar{v} = \sum_{i=1}^m \frac{n_i k_{int}^i e^{-\phi_i(\bar{v})} C}{1 + k_{int}^i e^{-\phi_i(\bar{v})} C} \quad (60)$$

### b) - Analyse des données expérimentales

Quand on étudie un système d'interaction métal-protéine, on ne connaît ni le nombre  $n$  d'emplacements susceptibles de réagir avec les ions métalliques, ni les constantes d'association correspondant à chaque groupe d'emplacements. L'expérience permet de calculer  $\bar{v}$  et, généralement, la concentration en ions métalliques est connue. Il faut donc trouver une représentation graphique commode de l'équation (55) permettant à partir de  $[C]$  et de  $\bar{v}$  de connaître  $k$  et  $n$ . Si on multiplie les deux membres de l'équation (55)





par  $\frac{n - \bar{v}}{C}$  on obtient

$$\frac{\bar{v}}{C} = kn - k\bar{v} \quad (61)$$

Si les sites sont identiques et indépendants, la variation de  $\frac{\bar{v}}{C}$  en fonction de  $\bar{v}$  est représentée par une droite dont l'intersection avec l'axe des abscisses est  $n$  et l'intersection avec celui des ordonnées est  $kn$ .

Ce type de représentation a été initialement employé par SCATCHARD<sup>(24-25)</sup>, c'est celui que nous avons utilisé. Si les sites ne sont pas identiques mais toutefois sans interaction les uns sur les autres, la représentation  $\frac{\bar{v}}{C} = f(\bar{v})$  n'est plus une droite mais on peut écrire que

$$\lim_{C \rightarrow \infty} \bar{v} = \sum_{i=1}^m n_i \quad (62) \quad \text{et} \quad \lim_{C \rightarrow 0} \frac{\bar{v}}{C} = \sum_{i=1}^m n_i k_i \quad (63)$$

l'équation (59) pouvant s'écrire

$$\frac{\bar{v}}{C} = \sum_{i=1}^m k_i (n_i - \bar{v}) \quad (64)$$

Les limites représentent, comme dans le cas précédent, l'intersection de la courbe expérimentale avec les axes de coordonnées. Il est souvent difficile dans ce cas d'atteindre les  $n_i$  et  $k_i$  respectifs correspondant à chaque série d'emplacements.

Nous avons donc calculé  $\frac{\bar{v}}{Zn^{++}}$  pour toutes les solutions étudiées et porté  $\frac{\bar{v}}{(Zn^{++})} = f(\bar{v})$



α) - Milieux tampon acide acétique-acétate de sodium, pH = 6,3, pH = 7,1 et  
pH = 7,4, t = 25°C

La figure 20 montre le manque de linéarité dans la distribution des points expérimentaux, ce qui prouve la présence de sites différents participant à l'interaction. Cependant, on peut dégager de cette courbe  $\frac{\bar{v}}{(\text{Zn}^{++})} = f(\bar{v})$  qu'il existe probablement un groupe de 6 sites qui semblent identiques.

Les mêmes remarques peuvent s'appliquer aux figures 21 et 22 qui représentent  $\frac{\bar{v}}{(\text{Zn}^{++})} = f(\bar{v})$  pour les pH 7,1 et 7,4.

A pH = 7,1, 7 sites identiques interviennent dans l'interaction entre l'ion zinc et l'albumine; à pH = 7,4 il semble que ce nombre soit 9.

Le calcul des constantes d'association à partir des courbes de SCATCHARD donne les valeurs suivantes :

|          |              |
|----------|--------------|
| pH = 6,3 | log k = 3,82 |
| pH = 7,1 | log k = 3,90 |
| pH = 7,4 | log k = 3,95 |

β) - Milieux tampon acide acétique-acétate de sodium, pH = 6; pH = 7,4;  
t = 37°C

Les figures 23 et 24 représentant  $\frac{\bar{v}}{(\text{Zn}^{++})} = f(\bar{v})$  permettent

de mettre en évidence que le nombre de sites intervenant dans la liaison  $\text{Zn}^{++}$  - S.A.H. est plus important à 37°C qu'à 25°C.

|               |        |                 |
|---------------|--------|-----------------|
| Pour pH = 6   | n = 8  | et log k = 3,63 |
| Pour pH = 7,4 | n = 13 | et log k = 3,57 |

Pour comparer les valeurs des constantes d'association à la constante de l'équilibre imidazole-zinc dans les mêmes milieux, il faudrait pouvoir atteindre en fait les constantes intrinsèques des divers équilibres et surtout tenir compte des interactions électrostatiques.



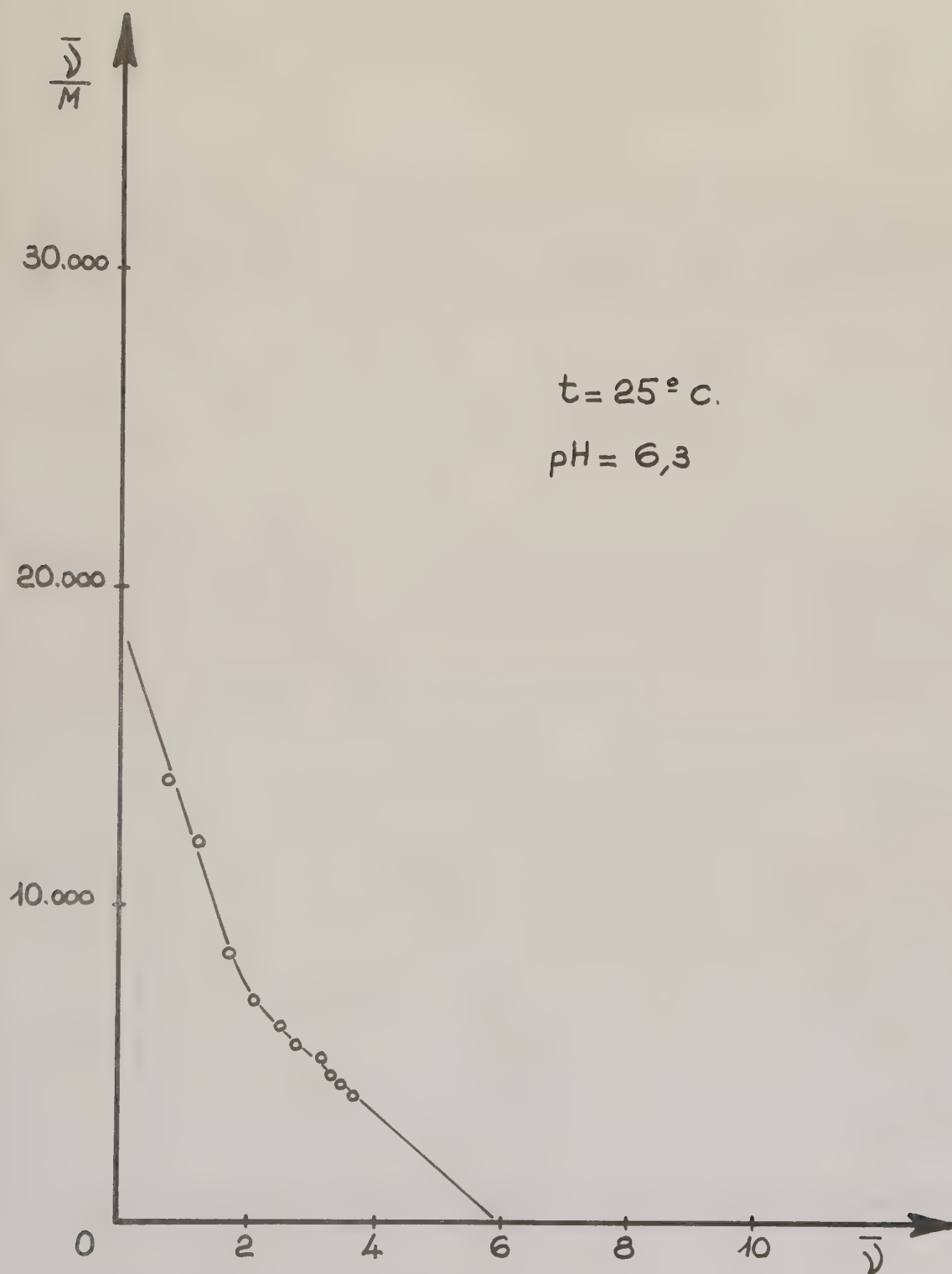


Fig. 20



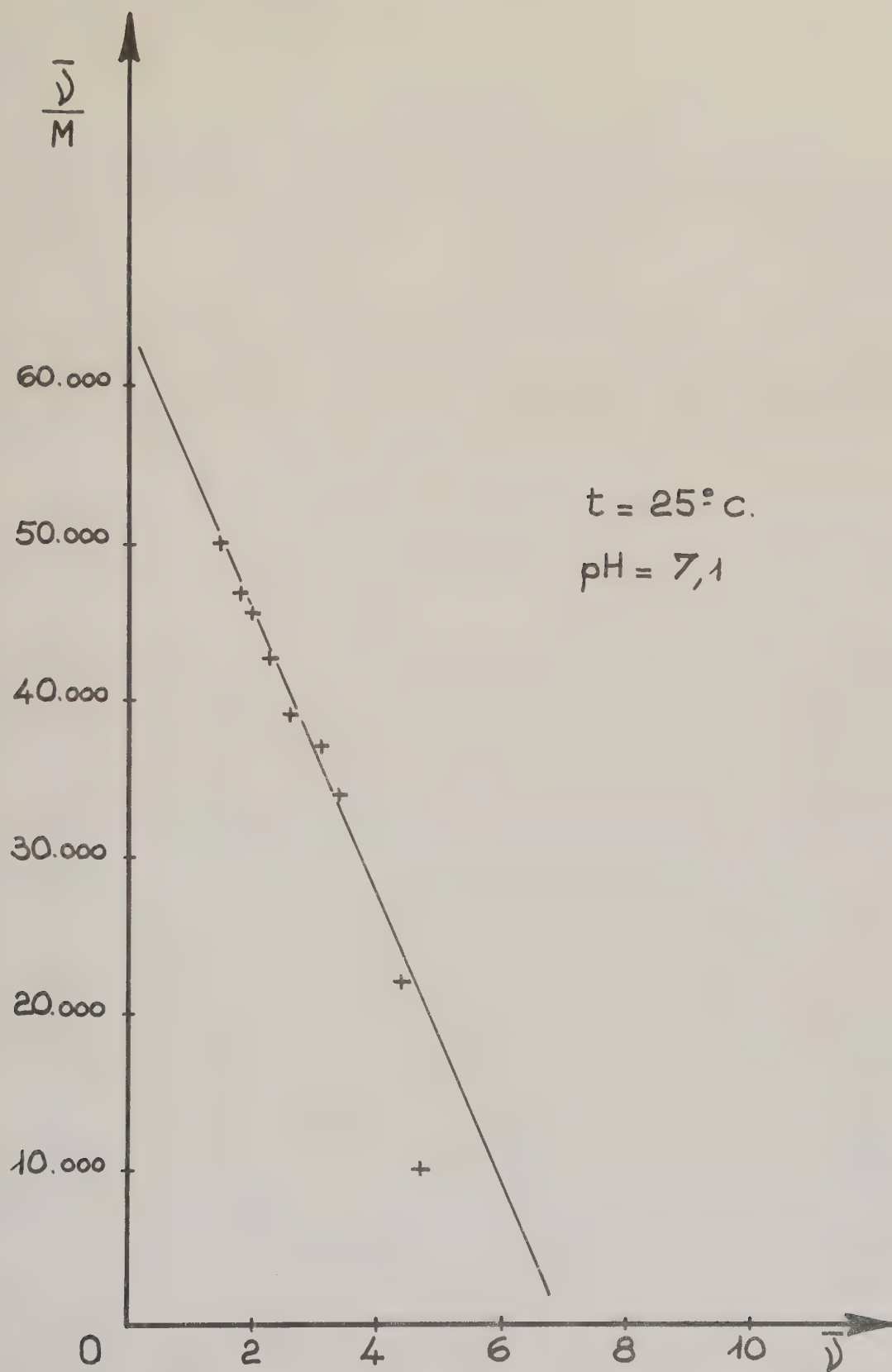


Fig. 21





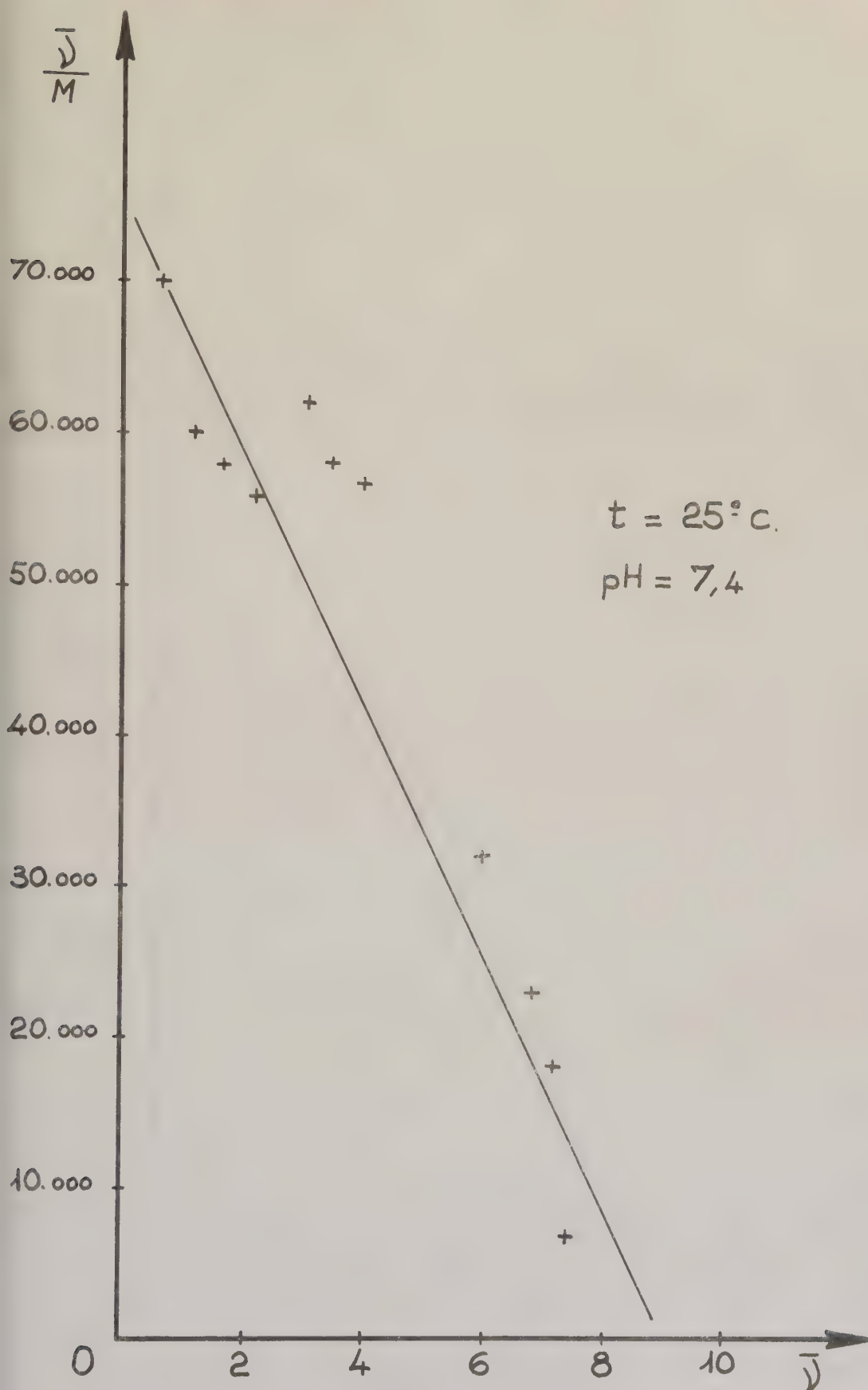


Fig. 22



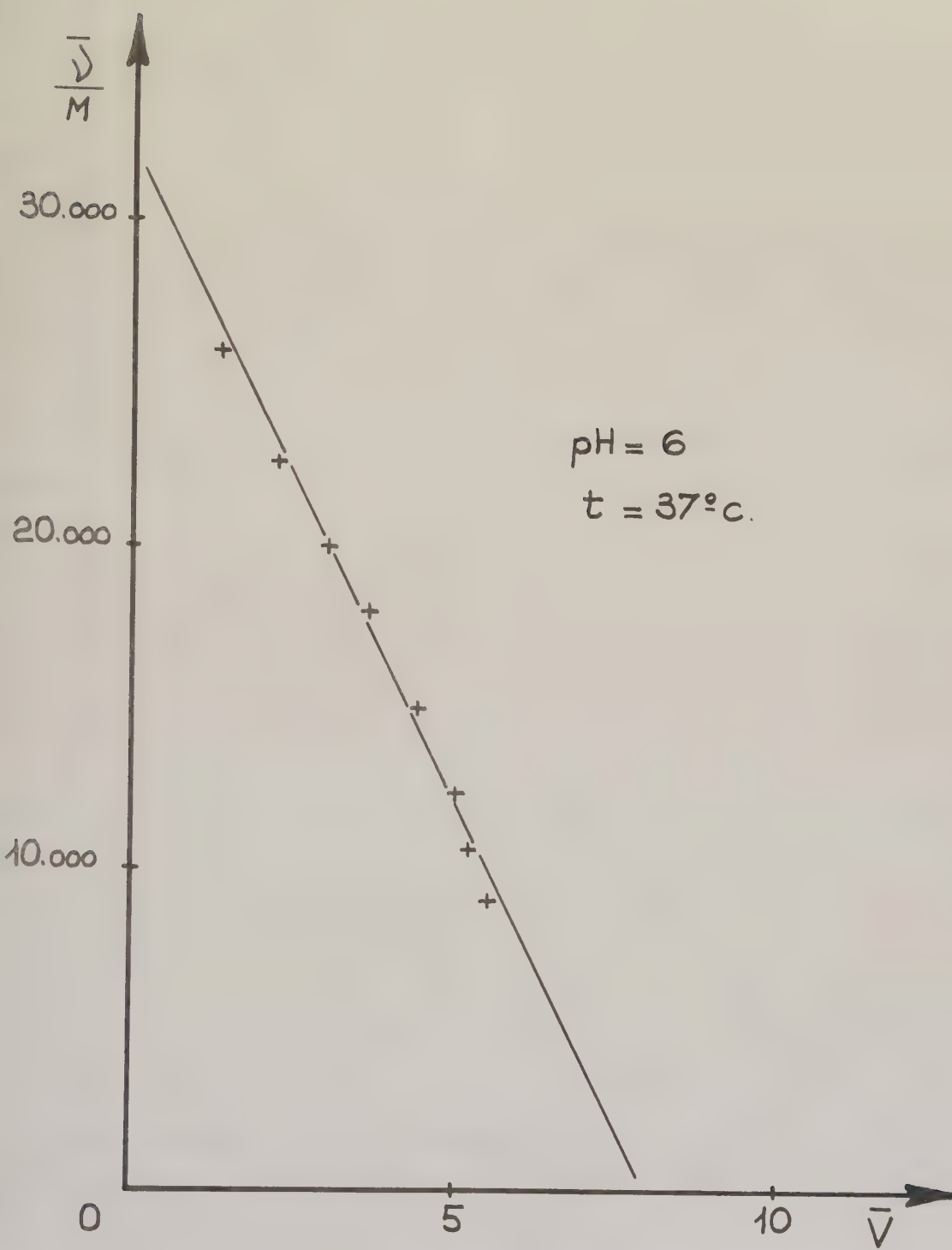


Fig. 23



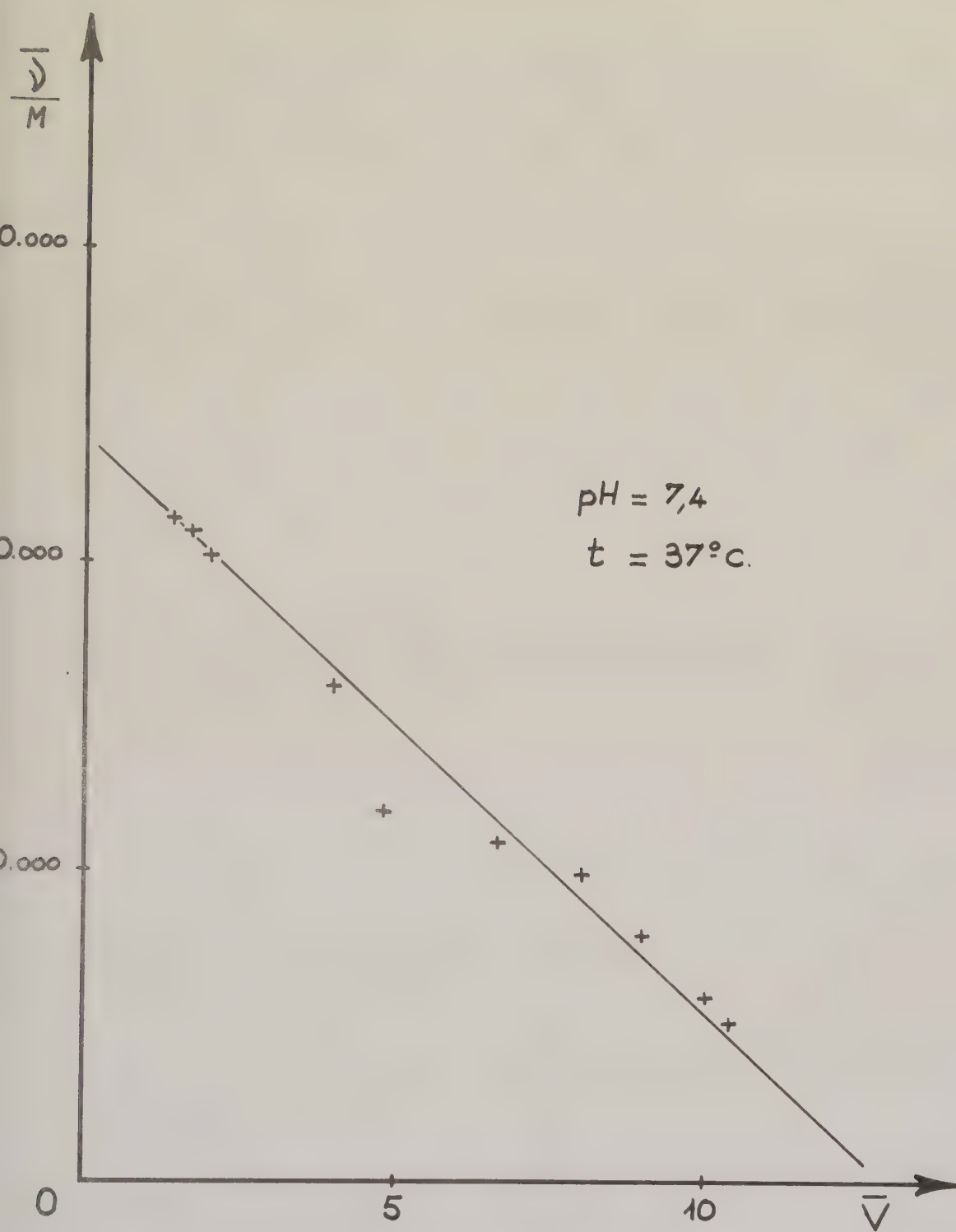


Fig. 24



### c) - Interaction électrostatique

Lorsque la molécule de protéine fixe des ions, la charge nette est modifiée et le travail de formation d'un complexe nouveau avec un ion de la même espèce augmente ou diminue quelle que soit la nature de l'emplacement engagé.

Pour évaluer le travail électrostatique  $w$  nécessaire pour amener un ion  $M$  à la surface de la molécule protéique, on est obligé d'assimiler la molécule de protéine à une sphère rigide uniformément chargée (68).

$$w = \frac{e^2}{2 D R T} \left( \frac{1}{b} - \frac{X}{1 + Xa} \right) \quad (65)$$

où  $e$  est la charge élémentaire

$b$  le rayon de la protéine

$a$  le diamètre de collision ion-protéine

$X$  est la constante de DEBYE-HUICKEL proportionnelle à la racine carrée de la force ionique.

On peut montrer que

$$k = k^0 e^{-2w} Z_p Z_M \quad (66)$$

où  $Z_p$  est la charge portée par la protéine

$Z_M$  la charge de l'ion  $M$ .

Il est difficile d'évaluer le facteur électrostatique ainsi que le montre l'équation (66).

D'une part  $w$  sera calculé approximativement puisque l'on choisit un modèle sphérique et rigide de la molécule de protéine, d'autre part il est nécessaire pour estimer la charge nette de la molécule de protéine de tenir compte de tous les ions fixés.

$$Z_p = \sum Z_i \bar{v}_i \quad (67)$$





Pour le système d'interaction  $\text{Zn}^{++}$ -S.A.H. en milieu tampon acétate de sodium-acide acétique,

$$Z_P = \bar{V}_{H^+} + \bar{V}_{CH_3COO^-} + \bar{V}_{Cl^-} + \bar{V}_{Zn^{++}} \quad (68)$$

Nous avons montré que l'ion sodium ne se fixait pas. Il faudrait également être sûr de la forme sous laquelle les ions zinc se fixent puisque certains auteurs pensent que les ions zinc sont en fait sous la forme  $\text{ZnAc}^+$ .

w a été calculé par TANFORD<sup>(68)</sup> suivant la force ionique des solutions étudiées. Pour  $\Gamma/2 = 0,1$ ,  $w = 0,025$ .

Mais nous n'avons pas trouvé dans la littérature de mesure de  $Z_P$ , par exemple par des études électrophorétiques, pour les mêmes milieux réactionnels que ceux que nous avons étudiés.

Notre travail doit donc être complété sur ce point et les valeurs des constantes d'association des équilibres multiples  $\text{Zn} - \text{S.A.H.}$  sont simplement indicatives puisque non corrigées du facteur électrostatique.

$$K_O = K_e^{0,1 Z_P} \quad (69)$$

#### IV - ETUDE DES SYSTEMES IMIDAZOLE-ION ZINC ET HISTIDINE-ION ZINC PAR LA METHODE DES COEFFICIENTS DE SELF-DIFFUSION

On connaît depuis longtemps les complexes entre l'imidazole et le zinc et de nombreuses études ont été faites sur la structure de ces complexes à l'état solide. Une revue sur ce sujet a été récemment publiée (98).

Les spectres infra-rouge et Raman des complexes entre l'imidazole et divers métaux tels que le zinc, le cuivre, l'argent ont été étudiés à l'état solide<sup>(99)</sup>.

En solution aqueuse, quelques complexes de l'imidazole et de différents ions métalliques ont fait l'objet d'études par spectroscopie infra-rouge (100).



L'interaction entre l'imidazole et les ions zinc et cuivre a été déterminée par CURD et ses collaborateurs<sup>(101)</sup> en mesurant le pH des solutions contenant de l'imidazole, des ions imidazolium et des ions zinc ou cuivre à une force ionique constante 0,16. Dans les deux cas, ils ont trouvé que le nombre de coordination de l'ion pour l'imidazole est 4 et ils ont déterminé les constantes d'association intrinsèques correspondant à chacun des quatre équilibres.

$$\begin{aligned}
 \text{Si} \quad k_1 &= \frac{(M \text{ Im}^{++})}{(M^{++}) (Im)} \\
 k_2 &= \frac{(M \text{ Im}_2^{++})}{\left\{ \begin{matrix} M \text{ Im}^{++} \\ M \text{ Im}_3^{++} \end{matrix} \right\} (Im)} \\
 k_3 &= \frac{(M \text{ Im}_2^{++}) (Im)}{(M \text{ Im}_2^{++}) (Im)} \\
 k_4 &= \frac{(M \text{ Im}_4^{++})}{(M \text{ Im}_3^{++}) (Im)}
 \end{aligned} \quad (70)$$

les constantes intrinsèques  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$  et  $K_4$  sont reliées aux constantes d'équilibre par

$$K_1 = \frac{k_1}{4} \quad K_2 = \frac{2k_2}{3} \quad K_3 = \frac{3k_3}{2} \quad \text{et} \quad K_4 = 4k_4 \quad (71)$$

Pour  $t = 24^\circ\text{C}$ ,  $\log K_1 = 1,98$ ,  $\log K_2 = 2,19$ ,  $\log K_3 = 2,41$  et  $\log K_4 = 2,62$ .

Par potentiométrie on a pu déterminer les premières constantes d'association de l'histidine et de l'imidazole avec divers ions métalliques (102).

Les mesures sont faites en milieu non tamponné à  $25^\circ\text{C}$ . Pour l'ion zinc,  $\log k_1 = 6,57$  pour la réaction histidine -  $\text{Zn}^{++}$ , et  $\log k_1 = 2,13$  pour la réaction imidazole -  $\text{Zn}^{++}$ .

Par polarographie on a pu mettre en évidence de tels complexes  $M(\text{Im}_4)^{++}$  en solution aqueuse (103).



WANG et LI<sup>(104)</sup> ont étudié les complexes entre l'imidazole et l'ion zinc d'une part, les complexes ternaires Zn-Im-purine et Im-Zn-cytosine d'autre part par R.M.N. dans le diméthylsulfoxyde. L'effet du chlorure de zinc sur les signaux des protons du noyau imidazole montre qu'il se forme un complexe stable Zn-imidazole. Suivant la concentration en chlorure de zinc dans le milieu réactionnel, il y a d'abord, comme en solution aqueuse, formation d'un complexe  $Zn(Im)_4^{++}$ , puis, quand la concentration en chlorure de zinc est supérieure à celle en imidazole, il y a formation d'un complexe  $Zn(Im)^{++}$ .

Nous avons essayé d'appliquer la méthode des coefficients de self-diffusion aux interactions entre l'ion zinc et l'imidazole en milieu aqueux d'une part et, entre l'ion zinc et l'histidine en milieu tampon de force ionique constante d'autre part, mais ainsi que nous l'avons souligné au chapitre IV, les résultats n'ont qu'une valeur qualitative.

## 1 - Etude des interactions entre l'imidazole et l'ion zinc

### a) - Résultats expérimentaux

Nous avons mesuré les coefficients de self-diffusion de l'ion zinc et de l'imidazole dans des solutions aqueuses de chlorure de zinc et d'imidazole de concentrations variables dont le pH est ajusté à pH = 6,9 par une solution 1N en acide chlorhydrique.

Ainsi que nous l'avons décrit au chapitre IV, l'application de la formule  $D = \sum x_i D_i$  au système imidazole-zinc conduit à la formule (72)

$$\frac{(Im)_{lié}}{(Zn)_{lié}} = \frac{D_{Zn} - D_C}{D_{Zn} - D_{Im}} \cdot \frac{D_{Im} - D_{Im}^m}{D_{Zn} - D_{Zn}^m} \cdot \frac{(Im)_{tot}}{(Zn)_{tot}} \quad (72)$$

où  $D_{Zn}$  est le coefficient de self-diffusion du zinc dans le milieu réactionnel sans imidazole.

$D_{Zn}^m$  est le coefficient de self-diffusion du zinc dans le même milieu réactionnel mais contenant une concentration donnée en imidazole.



$D_{Im}$  est le coefficient de self-diffusion de l'imidazole dans le milieu réactionnel sans chlorure de zinc.

$D_{Im}^m$  est le coefficient de self-diffusion de l'imidazole dans le même milieu réactionnel mais contenant une concentration donnée en chlorure de zinc.

$D_C$  est le coefficient de self-diffusion du complexe.

Nous avons obtenu les résultats expérimentaux suivants :

$$(Im) = 10^{-2} \text{ M/l} \quad D_{Im} = 1,86 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

A cette solution nous ajoutons du chlorure de zinc

$$(Im) = 10^{-2} \text{ M/l} + (Zn^{++}) = 10^{-3} \text{ M/l} \quad D_{Im}^m = 1,94 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

$$(Im) = 10^{-2} \text{ M/l} + (Zn^{++}) = 5 \cdot 10^{-3} \text{ M/l} \quad D_{Im}^m = 1,88 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

$$(Im) = 10^{-2} \text{ M/l} + (Zn^{++}) = 10^{-2} \text{ M/l} \quad D_{Im}^m = 1,86 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

$$\text{Pour } (Im) = 10^{-1} \text{ M/l} \quad D_{Im} = 1,73 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

A cette solution nous ajoutons du chlorure de zinc

$$(Im) = 10^{-1} \text{ M} + (Zn^{++}) = 10^{-2} \text{ M} \quad D_{Im}^m = 1,85 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

$$(Im) = 10^{-1} \text{ M} + (Zn^{++}) = 10^{-1} \text{ M} \quad D_{Im}^m = 1,74 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Quand on marque ces mêmes solutions par l'isotope  $Zn^{65}$  on obtient

$D_{Zn}^m$

$$(Im) = 10^{-2} \text{ M/l} + (Zn^{++}) = \text{traces} \quad D_{Zn}^m = 0,58 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

$$(Im) = 10^{-2} \text{ M/l} + (Zn^{++}) = 10^{-3} \text{ M/l} \quad D_{Zn}^m = 0,61 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

$$(Im) = 10^{-2} \text{ M/l} + (Zn^{++}) = 5 \cdot 10^{-3} \text{ M/l} \quad D_{Zn}^m = 0,63 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

$$(Im) = 10^{-2} \text{ M/l} + (Zn^{++}) = 10^{-2} \text{ M/l} \quad D_{Zn}^m = 0,67 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

$$(Im) = 10^{-1} \text{ M/l} + (Zn^{++}) = \text{traces} \quad D_{Zn}^m = 0,58 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

$$(Im) = 10^{-1} \text{ M/l} + (Zn^{++}) = 10^{-2} \text{ M/l} \quad D_{Zn}^m = 0,65 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

$$(Im) = 10^{-1} \text{ M/l} + (Zn^{++}) = 10^{-1} \text{ M/l} \quad D_{Zn}^m = 0,69 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

$$(Zn^{++}) = 10^{-3} \text{ M/l} \quad D_{Zn} = 0,73 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$





b) - Interprétation de ces résultats

Si on considère les coefficients de self-diffusion de l'ion zinc, pour deux concentrations différentes en imidazole, le zinc étant à l'état de traces, on obtient le même coefficient de self-diffusion  $D_{Zn}^m = 0,58 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ . On peut donc considérer que l'on obtient alors le coefficient du complexe  $D_C$ .

Ensuite,  $D_{Zn}^m$  augmente car il y a dans la solution des ions zinc libres diffusant plus rapidement que le complexe avec l'imidazole.

Par contre, il est surprenant que le coefficient de self-diffusion de l'imidazole augmente lorsque l'on ajoute du chlorure de zinc à la solution. Nous avons pensé qu'il pouvait y avoir des échanges entre le tritium qui marque l'imidazole et les hydrogènes de la solution. Même si cet échange existe, les mesures de viscosité des solutions montrent le même effet que les coefficients de self-diffusion (tableau XXV).

--- TABLEAU XXV ---

| (Im) M/l  | (ZnCl <sub>2</sub> ) M/l | $\eta$ cps |
|-----------|--------------------------|------------|
| $10^{-2}$ | 0                        | 0,9855     |
| $10^{-2}$ | $10^{-3}$                | 0,9688     |
| $10^{-2}$ | $5 \cdot 10^{-3}$        | 0,9913     |
| $10^{-2}$ | $10^{-2}$                | 1,004      |
| $10^{-1}$ | 0                        | 1,0212     |
| $10^{-1}$ | $10^{-2}$                | 1,002      |
| $10^{-1}$ | $5 \cdot 10^{-2}$        | 1,0259     |
| $10^{-1}$ | $10^{-1}$                | 1,0727     |

Nous observons une diminution de la viscosité des solutions quand on ajoute du chlorure de zinc à la solution d'imidazole.

Il existe peut-être en solution des agglomérats imidazole-eau, imidazole-imidazole, agglomérats qui seraient plus ou moins détruits par



l'ion  $Zn^{++}$ .

Le zinc donne alors avec l'imidazole des complexes de taille moindre, cette hypothèse explique l'augmentation du coefficient de self-diffusion de l'imidazole, la diminution de viscosité des solutions et la diminution du coefficient de self-diffusion de l'ion zinc.

## 2 - Interactions entre l'histidine et l'ion zinc

Nous avons mesuré les coefficients de self-diffusion de l'histidine et du zinc en milieu tampon acide acétique-acétate de sodium de pH = 6 et pH = 7,  $\Gamma/2 = 0,1$ ,  $t = 25^\circ C$ .

Nous avons vu que :

$$\frac{(Hist)_{lié}}{(Zn^{++})_{lié}} = \frac{D_{Zn} - D_C}{D_H - D_C} \times \frac{D_H - D_H^m}{D_{Zn} - D_{Zn}^m} \times \frac{(Hist)_{tot}}{(Zn^{++})_{tot}} \quad (73)$$

où  $D_C$  est le coefficient de self-diffusion du complexe histidine- $Zn^{++}$

$D_H^m$  est le coefficient de self-diffusion "moyen" de l'histidine

$D_{Zn}^m$  est le coefficient de self-diffusion "moyen" de l'ion  $Zn^{++}$

$D_H$  et  $D_{Zn}$  les coefficients de self-diffusion de l'histidine et de l'ion zinc dans le milieu tampon.

Pour atteindre  $D_C$ , en première approximation on peut considérer

que lorsque  $\frac{(Hist)_{tot}}{(Zn^{++})_{tot}} = 10$  tout le zinc est complexé et  $D_C = D_{Zn}^m$ . L'équa-

tion (73) se simplifie et devient :

$$\frac{(Hist)_{lié}}{(Zn^{++})_{lié}} = \frac{D_H - D_H^m}{D_{Zn} - D_{Zn}^m} \times 10 \quad (74)$$

Pour pH = 7,1,  $(Hist)_{tot} = 10^{-2}M$  et  $(Zn^{++})_{tot} = 10^{-3}M$ , nous avons obtenu les résultats suivants.



$$\begin{aligned} D_H &= 0,65 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s} \\ D_H^m &= 0,62 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s} \\ D_{Zn}^m &= 0,524 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s} \\ D_{Zn} &= 0,65 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s} \end{aligned}$$

$$\frac{(Hist)_{lié}}{(Zn^{++})_{lié}} = \frac{0,65 - 0,62}{0,65 - 0,524} \times 10 \sim 2$$

Pour  $pH = 6$ ,  $(Hist) = 10^{-M}$ ,  $(ZnCl_2) = 10^{-2M}$ , nous avons obtenu les résultats suivants :

$$\begin{aligned} D_H &= 0,65 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s} \\ D_{Zn} &= 0,61 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s} \\ D_H^m &= 0,55 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s} \\ D_{Zn}^m &= 0,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s} \end{aligned}$$

On trouve alors 
$$\frac{(H)_{lié}}{(Zn^{++})_{lié}} \sim 2$$

Donc, dans les deux systèmes étudiés, nous avons trouvé que le complexe en solution est formé de deux molécules d'histidine pour un ion zinc. Il faut souligner que ces résultats ne sont que qualitatifs car le calcul d'erreur exposé au chapitre IV montre que la précision est de l'ordre de 35 %.

Aussi, tout ce que l'on peut conclure de ces mesures est qu'il y a abaissement du coefficient de self-diffusion de chacune des espèces en présence,  $D_H^m < D_H$  et  $D_{Zn}^m < D_{Zn}$  et que cet abaissement est explicable par la formation d'un complexe.

L'histidine, comme la Serum Albumine Humaine, donne des complexes avec les ions  $Zn^{++}$  dans les milieux tampons acide acétique-acétate de sodium aux  $pH = 6$  et  $pH = 7,1$ .



-- CHAPITRE VIII --



INTERACTIONS ENTRE LE CUIVRE ET LES PROTEINES



I - INTERACTIONS ENTRE LE CUIVRE ET L'ALBUMINE

1 - Rappel des travaux déjà effectués

Bien que de nombreuses études aient été faites sur les interactions entre le cuivre et l'albumine, les auteurs ne s'accordent pas pour définir les sites participant à la liaison.

Les complexes entre le cuivre et la Serum Albumine absorbent fortement dans la zone spectrale de l'U.V. aussi, on a pu les étudier qualitativement par spectroscopie et quantitativement par des méthodes classiques telles que la dialyse d'équilibre.

URIEL<sup>(23)</sup>, en suivant les modifications spectrales de la molécule de protéine en présence de cuivre et en étudiant parallèlement les spectres d'absorption des complexes entre le cuivre et divers acides aminés, a pu montrer que seuls l'histidine, l'histamine et le Méthyl-1 Histidine donnent un maximum d'absorption situé au même endroit que celui des complexes Cu-S.A.H. Par dialyse d'équilibre il a déterminé le nombre de sites liants (8 à 10) dans un domaine de pH 4,8 à 6,4 en milieu tampon acétate de sodium. L'évaluation des constantes intrinsèques de liaison  $K_{int}^o$  lui permet de conclure que les sites actifs sont les groupements imidazole.

GURD a montré que le cuivre et le zinc étaient en compétition pour les mêmes sites de liaison, et, comme le zinc se fixe sur les groupements imidazole, il pense que ce sont bien ces groupements qui sont impliqués dans la liaison Cu-S.A.H.





Cependant, KLOTZ<sup>(105)</sup> estime que les groupements carboxyle participent à l'interaction entre le cuivre et l'albumine à pH = 4,8, en milieu tampon acétate de sodium. En effet, le degré de fixation du cuivre augmente entre pH 4 et 6,5 et KLOTZ attribue cette augmentation à un changement de sites complexants, mais on peut également justifier l'augmentation de  $\bar{v}_{Cu^{++}}$  avec le pH en tenant compte de l'interaction compétitive entre le cuivre et les protons ainsi que des variations du facteur électrostatique.

L'acétylation d'une partie des groupements carboxyle abaisse le taux de fixation,  $\bar{v}_{Cu^{++}}$ . Mais, ainsi que le fait remarquer URIEL<sup>(23)</sup>, l'acétylation modifie la charge nette Zp de la macromolécule qui devient alors fortement positive; il est normal que, quels que soient les sites liants, le facteur électrostatique étant défavorable à la fixation du cuivre,  $\bar{v}_{Cu^{++}}$  diminue. URIEL à partir des arguments mêmes de KLOTZ montre que la fixation du cuivre sur les groupements carboxyle, bien que théoriquement possible, a cependant peu de chance de se produire.

D'autres groupements sont impliqués dans la liaison entre l'ion cuivrique et l'albumine.

KLOTZ<sup>(107-106)</sup> a montré que la liaison des ions cuivriques par l'albumine de boeuf produit une bande d'absorption caractéristique à 375 nm. Cette bande provient de la liaison entre l'ion cuivrique et le groupe sulfhydryle.

En plus du cuivre lié sur le groupement sulfhydryle de la molécule d'albumine, divers auteurs<sup>(92-108)</sup> ont mis en évidence un site actif autre que le groupement sulfhydryle qui lie très fortement un ion-gramme de cuivre<sup>II</sup>. La réaction n'est pas gênée par la présence d'ions  $Ag^+$  ou  $Hg^{++}$  donc il ne peut s'agir du groupement sulfhydryle. On a d'abord pensé que le site impliqué dans cette liaison est l'azote terminal de la molécule d'albumine (109) mais la constante de stabilité du complexe est trop grande, et, pour rendre compte de ce fait d'autres groupes doivent participer à la liaison.

Des études plus récentes (110) impliquent la participation d'un azote peptidique en plus du groupement  $\alpha$ -amino terminal.

PETERS<sup>(111)</sup> a isolé un peptide à partir de l'albumine de boeuf composé de 24 amino-acides appelé fragment Asp qui a la même séquence terminale que la protéine.



L'albumine et le peptide lient un seul ion cuivre. L'histidine qui occupe la position 3 sur la chaîne peptidique participe à la liaison ainsi que le groupe  $\alpha$ -amino terminal.

En résumé, on peut dire que le cuivre se lie fortement à l'albumine, que le nombre de sites liants est à peu près 10 à pH = 6,4 (au-delà on aura hydrolyse de l'ion cuivrique). Une partie de ces sites est composée par les groupements imidazole des résidus histidiniques de la molécule d'albumine. L'autre partie comprend le groupement sulfhydryle et l'azote terminal accompagnés de l'histidine en position 3. C'est le calcul des constantes intrinsèques d'association qui a permis d'identifier les sites imidazole ainsi que l'étude des spectres U.V. des complexes  $\text{Cu}^{++}$ -Serum Albumine Humaine. Il ne semble pas que les groupements carboxyle participent à la liaison.

## 2 - Résultats Expérimentaux

L'étude des interactions entre l'ion cuivrique et la Serum Albumine Humaine a été abordée par la méthode des coefficients de self-diffusion. Cette étude est partielle; nous donnons cependant les résultats obtenus car ils permettent de montrer que la méthode utilisée est tout à fait générale et particulièrement adaptée pour tester s'il y a ou non interaction entre les métaux et les protéines.

La difficulté des mesures est due à la très faible période de l'isotope  $\text{Cu}^{64}$ , 12,8 heures. Toutes les expériences décrites ont donc été faites en même temps, avec le même lot de chlorure cuivrique marqué.

### a) - Milieu tampon acide acétique-acétate de sodium, pH = 3,6

La force ionique est  $I/2 = 0,2$  et la concentration en Serum Albumine Humaine est fixée à  $10^{-5}\text{M}$ .

Les résultats sont portés dans le tableau XXVI.



--- TABLEAU XXVI ---

| $(\text{CuCl}_2) \times 10^4 \text{M}$ | $D_{\text{Cu}} \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$ | $D_{\text{Cu}}^m \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$ |
|----------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 1,96                                   | 0,575                                             | 0,572                                               |
| 12,5                                   | 0,575                                             | 0,570                                               |

Si l'on fait la correction de viscosité,  $\eta_{\text{SAH}}/\eta = 1,01$   
on trouve que  $D_{\text{Cu}}^m$  et  $D_{\text{Cu}}$  sont identiques aux erreurs d'expérience près.

Donc, dans le milieu tampon de pH = 3,6, il n'y a pas d'interaction entre l'ion cuivrique et la Serum Albumine Humaine.

b) - *Milieu tampon acide acétique-acétate de sodium* pH = 5,6,  $\Gamma/2 = 0,2$   
.....  
 $t = 25^\circ\text{C}$   
.....

Nous avons porté dans le tableau XXVII et sur la fig. 25 les résultats expérimentaux obtenus.

Nous appelons  $D_{\text{Cu}}$  corrigé, le produit  $D_{\text{Cu}}^m \times \frac{\eta_{\text{SAH}}}{\eta}$

--- TABLEAU XXVII ---

| $(\text{CuCl}_2) \times 10^5 \text{M/l}$ | $D_{\text{Cu}}$ | $D_{\text{Cu}}^m$ | $D_{\text{Cu}}^m$ corrigé |
|------------------------------------------|-----------------|-------------------|---------------------------|
| 2                                        | 0,575           | 0,185             | 0,188                     |
| 12,5                                     | 0,575           | 0,402             | 0,404                     |
| 19,6                                     | 0,575           | 0,461             | 0,465                     |
| 125                                      | 0,575           | 0,527             | 0,529                     |



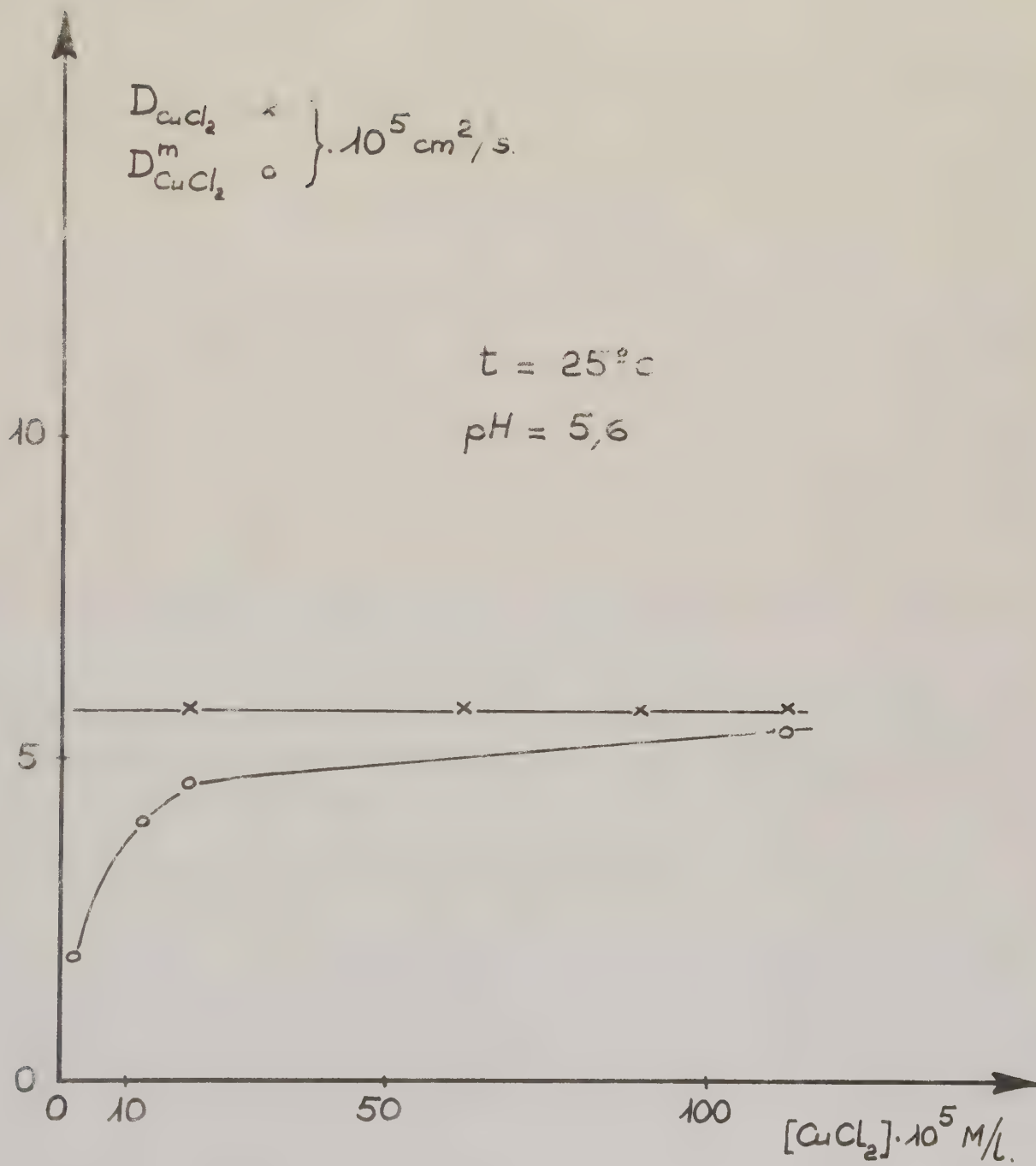


Fig. 25





Les valeurs de  $\bar{v}$  calculées par la formule (75)

$$\bar{v} = \frac{D_{Cu} - D_{Cu}^m}{D_{Cu} - D_{SAH}} \times \frac{(CuCl_2)_{totale}}{(SAH)_{totale}} \quad (75)$$

ne sont qu'approximatives car les résultats portés dans le tableau XXVII sont partiels.

On trouve qu'en fonction de la concentration  $\bar{v}$  augmente régulièrement (Tableau XXVIII)

-- TABLEAU XXVIII --

| $(CuCl_2) \times 10^5 M/l$ | $\bar{v}$ |
|----------------------------|-----------|
| 2                          | 1,51      |
| 12,5                       | 4,0       |
| 19,6                       | 4,2       |
| 125                        | 11,7      |

Ces mesures, pour être significatives, doivent être complétées et nous avons l'intention de continuer ce travail et d'étudier le système Serum Albumine Humaine-ion cuivre dans divers milieux pH et pour diverses températures.

## II - INTERACTIONS ENTRE LE CUIVRE ET LA GELATINE

Au laboratoire, on a étudié les interactions entre l'ion cuivrique et la gélatine<sup>(112)</sup>. Il était en effet intéressant d'appliquer notre méthode de mesure des coefficients de self-diffusion aux interactions entre les métaux et une macromolécule autre que la Serum Albumine Humaine.

Une partie des mesures a été faite en milieu non tamponné en faisant varier la concentration en chlorure de cuivre dans le milieu réactionnel. On mesure  $D_{Cu^{++}}$ , le coefficient de self-diffusion de l'ion cui-



vrique dans les solutions aqueuses de chlorure cuivrique, et  $D_{Cu^{++}}^{gel}$ , le coefficient de self-diffusion de l'ion cuivrique dans les mêmes solutions mais contenant 1 % de gélatine. Les résultats obtenus montrent que l'ion  $Cu^{++}$  se lie à la macromolécule et que notre méthode met en évidence cette interaction pour des concentrations en chlorure de cuivre comprises entre  $2 \cdot 10^{-3} M$  et 0,25 M. Ensuite, le nombre d'ions  $Cu^{++}$  libres est trop élevé pour que la diminution de  $D_{Cu^{++}}^{gel}$  par rapport à  $D_{Cu^{++}}$  soit significative.

Les résultats obtenus en milieu tampon acétate de sodium-acide acétique sont beaucoup plus intéressants.

Les milieux tampons employés sont identiques à ceux utilisés pour l'étude de l'interaction entre le cuivre et la Serum Albumine Humaine. La concentration en gélatine est 1%. Pour  $pH = 3,6$ ,  $D_{Cu^{++}}$  et  $D_{Cu^{++}}^{gel}$  sont identiques, il n'y a pas interaction entre l'ion cuivrique et la gélatine.

Par contre, pour le  $pH = 5,6$ , les résultats expérimentaux portés dans le tableau XIX mettent en évidence l'interaction entre la gélatine et l'ion cuivrique. Nous avons tracé (fig. 26) les variations de  $D_{Cu^{++}}$  et  $D_{Cu^{++}}^{gel}$  en fonction de la concentration en chlorure cuivrique.

--- TABLEAU XIX ---

| $(CuCl_2) \cdot 10^4 M/l$ | $D_{Cu} \times 10^5 cm^2/s$ | $D_{Cu}^{gel} \times 10^5 cm^2/s$ |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 0,75                      | 0,575                       | 0,455                             |
| 1,5                       | 0,575                       | 0,491                             |
| 2                         | 0,575                       |                                   |
| 4                         | 0,575                       |                                   |
| 4,74                      | 0,575                       | 0,538                             |
| 6,5                       | 0,575                       |                                   |
| 7,5                       | 0,575                       | 0,538                             |
| 10                        | 0,575                       | 0,540                             |
| 11                        | 0,575                       |                                   |



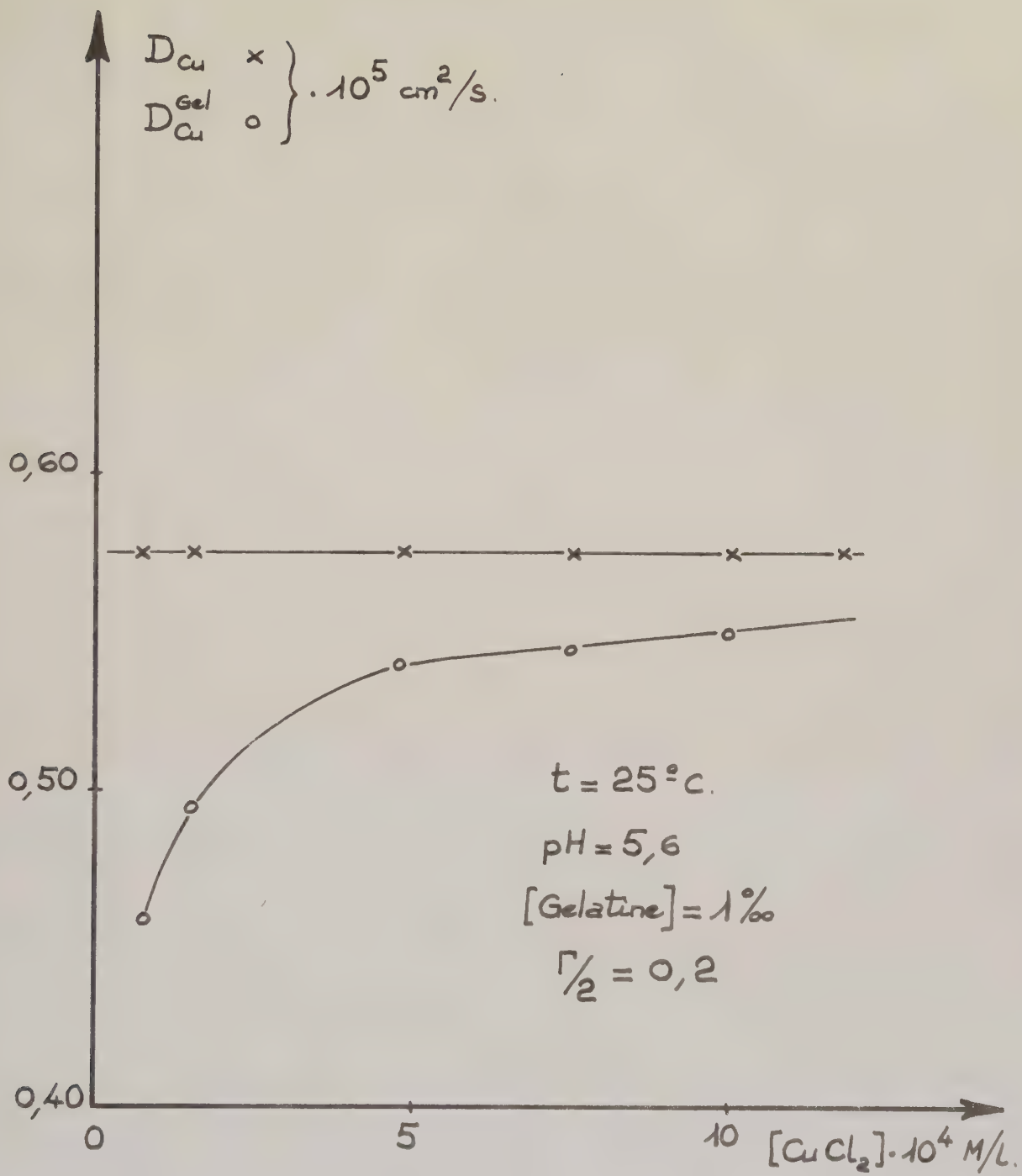


Fig. 26



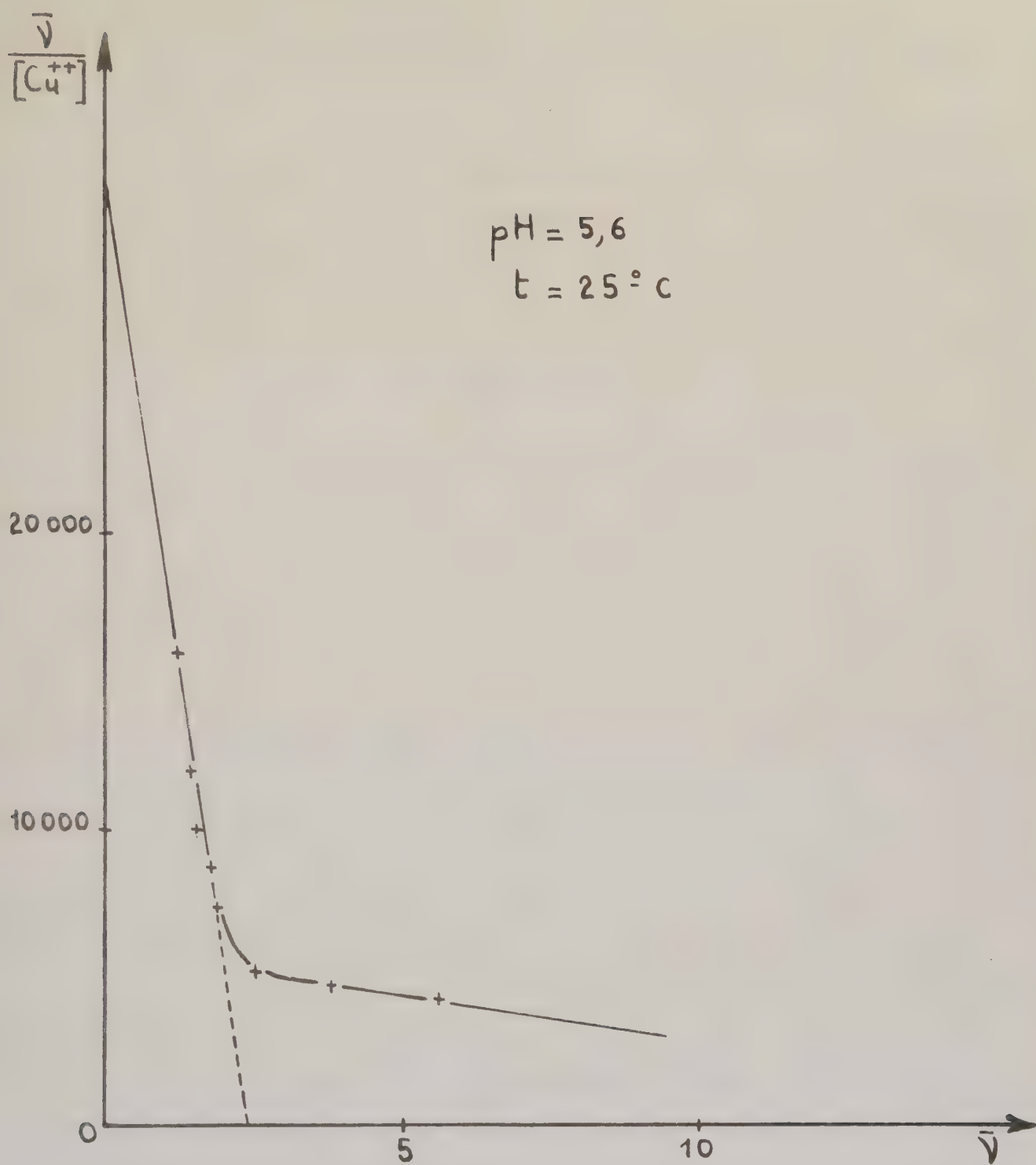


Fig. 27





Il n'est pas possible de calculer le nombre  $\bar{v}$  d'ions cuivriques liés par molécule de gélatine car nous ne disposons pas de gélatine marquée, donc nous ne pouvons déterminer le coefficient de self-diffusion de la macromolécule.

Cependant, si l'on suppose que le coefficient de self-diffusion de la gélatine est de l'ordre de grandeur de celui de l'albumine, précédemment déterminé dans ce milieu,  $D_{S.A.H.} = 0,60 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ , on peut calculer approximativement  $\bar{v}$  (Tableau XXX)

--- TABLEAU XXX ---

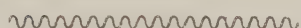
| $(\text{CuCl}_2) \times 10^4 \text{ M/l}$ | $\bar{v}_{\text{Cu}^{++}}$ | $\bar{v}/M \times 10^{-4}$ |
|-------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0,75                                      | 1,20                       | 1,6                        |
| 1                                         | 1,26                       | 1,20                       |
| 1,5                                       | 1,51                       | 1,00                       |
| 2                                         | 1,75                       | 0,87                       |
| 2,5                                       | 1,85                       | 0,74                       |
| 3                                         | 1,94                       | 0,65                       |
| 5                                         | 2,58                       | 0,51                       |
| 8                                         | 3,77                       | 0,47                       |
| 10                                        | 4,58                       | 0,46                       |
| 12,5                                      | 5,62                       | 0,45                       |

$\bar{v}_{\text{Cu}^{++}}$  augmente régulièrement avec la concentration en chlorure cuivrique du milieu.

La représentation de SCATCHARD,  $\bar{v}/M = f(\bar{v})$  (fig. 27) permet de mettre en évidence un premier groupe de sites actifs peu nombreux, 2 ou 3.



-- CONCLUSION --



Les interactions entre les métaux et les protéines ont fait l'objet de nombreuses études, il y a une dizaine d'années.

Des méthodes diverses ont été appliquées et elles ont permis de mettre en évidence les différences de comportement vis à vis des protéines, des métaux alcalins et alcalinoterreux d'une part, et, des métaux de transition. Puis, durant quelques années, les travaux portant sur ce problème se sont espacés et c'est l'application de nouvelles méthodes aux systèmes métal-protéiques qui rend ces questions à nouveau très actuelles.

Nous avons essayé d'appliquer la méthode des coefficients de self-diffusion qui a donné des résultats particulièrement spectaculaires dans le cas des mélanges binaires, à l'étude des interactions entre les métaux et la Serum Albumine Humaine. La mesure des coefficients de self-diffusion des ions métalliques en présence et en absence de protéine permet de calculer le nombre  $\bar{v}$  d'ions métalliques liés par molécule de Serum Albumine Humaine. L'intérêt de la méthode employée est que l'on peut opérer en milieu chimiquement homogène et utiliser de très faibles concentrations en sel métallique. On n'est limité que par l'activité spécifique des produits marqués. Nous avons choisi d'étudier ces interactions en milieu tampon de pH et de force ionique variés.

Nous avons remarqué la différence de comportement des divers ions étudiés.

La méthode est particulièrement sensible pour déceler s'il y a ou non interaction entre les ions métalliques et la protéine. Ainsi il ne semble pas que l'ion sodium soit lié à la Serum Albumine Humaine quel que soit le pH ou la concentration en ions sodium du milieu réactionnel. Nous avons pu déterminer à partir de quel pH les ions calcium, zinc et cuivre se lient à la macromolécule et mis en évidence la différence de comportement de ces divers ions. Le calcium semble présenter une certaine spécificité,



puis il y a prépondérance du facteur électrostatique quand la concentration en sel augmente dans le milieu réactionnel. Cet effet n'est pas mis en évidence pour l'ion zinc qui se lie très spécifiquement à la Serum Albumine Humaine. Suivant le pH et la température, le nombre maximum d'ions zinc liés varie. Il semble que la liaison soit la plus importante à 37°C et pour le domaine du pH physiologique.

Les groupements responsables de la liaison entre l'ion zinc et la Serum Albumine Humaine sont les groupements imidazole des résidus histidiniques. Aussi il est intéressant d'appliquer la méthode des coefficients de self-diffusion aux systèmes imidazole-ion zinc et histidine-ion zinc.

Nous avons pu mettre en évidence des complexes mais la méthode dans ces cas ne donne que des résultats qualitatifs.

L'influence du milieu tampon est facilement décelable, ainsi, nous avons été obligé de renoncer à employer le milieu véronal pour l'étude du système zinc-Serum Albumine Humaine.

Pour atteindre les constantes intrinsèques caractérisant les équilibres existant entre les métaux et les protéines, il est nécessaire de déterminer la charge moyenne,  $Z_p$ , portée par la macromolécule et il semble que la mesure des coefficients de self-diffusion de toutes les espèces en présence dans le milieu réactionnel puisse permettre, en choisissant les concentrations de ces espèces, d'atteindre  $Z_p$ . C'est ce que nous voulons essayer de faire prochainement.

L'intérêt de la méthode utilisée réside surtout dans sa généralité. Ainsi nous l'avons appliquée aux systèmes  $Ca^{++}$ -S.A.H.,  $Cu^{++}$ -S.A.H.,  $Zn^{++}$ -S.A.H.,  $Na^+$ -S.A.H.,  $Cu^{++}$ -gélatine. Au laboratoire, des mesures sont en cours concernant les interactions entre les acides nucléiques et les acides aminés. Nous désirons également compléter toutes les études faites jusqu' alors par la détermination des interactions entre les anions et les protéines.





--- BIBLIOGRAPHIE ---



- 1 - A. FICK, Pogg. Ann. 94, 50, (1855).
- 2 - B. BRUN, Thèse Doctorat es Sciences Physiques, Montpellier 1968.
- 3 - J. SALVINIEN, Techniques de l'Ingénieur, page 430, (1962).
- 4 - J. J. MOREAU, "Actes du Colloque sur la diffusion", Service de documentation et d'information technique, Aéronautique (1956).
- 5 - J.A. ANDERSON et K. SADDINGTON, J. Chem. Soc., 2, 381 (1949).
- 6 - J.H. WANG, J. am. Chem. Soc., 73, 520, (1951).
- 7 - R. MILLS, Review pure applied Chem., 11, 78, (1961).
- 8 - E. BERNE et BERGGREN, Acta chem. Scand., 11, 428, (1960).
- 9 - J. KRAUSS et J.W.T. SPINKS, Can. J. Chem., 32, 71 (1954).
- 10 - R. MILLS et J.W. KENNEDY, J. am. Chem. Soc., 75, 5696, (1953).
- 11 - R. MILLS et A.W. ADAMSON, J. am. Chem. Soc., 77, 3454, (1955).
- 12 - J.H. WANG, J. am. Chem. Soc., 74, 1182, (1952).
- 13 - J. TAURAS, S. LENGVEL et J. GIBER MAGYAR KERNIARI, Foly'wirat 69 érf (1963), 6 sz.
- 14 - E.J. COHN, W.L. HUGHES Jr. et J.H. WEARE, J. am. Chem. Soc., 69, 1753, (1947).
- 15 - P. AUSSEL, Thèse Doctorat es Sciences Physiques, Montpellier (1970).
- 16 - F.R.N. GURD, Chemical Specificity in Biological Interactions., Acad. Press. Inc., New-York, (1954).
- 17 - F.R.N. GURD et P.E. WILCOX, Complex formation with metallic cations and Proteins, Peptides and Aminoacids., Adv. in Protein Chemistry, 11, 311, (1956).
- 18 - I.M. KLOTZ, "Protein Interactions" dans H. NEURATH et K. BAILEY, The Proteins, p. 737, (1958).
- 19 - C. TANFORD, Physical Chemistry of Macromolecules, J. Wiley and Sons Inc., (1961).
- 20 - G. SCATCHARD, American Scientist, 40, 61, (1949).
- 21 - B.L. VALLEE et W.E.C. WACKER, dans Metalloproteins de H. NEURATH (1970)
- 22 - E.G. WEIR et A.B. HASTINGS, J. Biol. Chem., 114, 397, (1936).
- 23 - J. URIEL, Biol. Med. 50, 27, (1961).





- 24 - G. SCATCHARD, I.A. SCHEMBERG et S.H. AMSTRONG Jr., J. am. Chem. Soc., 72, 535, (1950).
- 25 - G. SCATCHARD, I.A. SCHEMBERG et S.H. AMSTRONG Jr., J. am. Chem. Soc., 72, 540, (1950).
- 26 - G. SCATCHARD et E.S. BLACK, J. Phys. and. colloid. Chem., 53, 88, (1949)
- 27 - D.J. PERKINS et A. CODDINGTON, Biochim., Biophys. Acta, 44, 361, (1960).
- 28 - H. HOLEYSOVSKA, Collect. Czechoslov. Chem. Commun. 26, 3074, (1961).
- 29 - F.R.N. GURD et D. GOODMAN, J. am. Chem. Soc., 74, 671, (1952).
- 30 - D.J. PERKINS, Biochem. J., 69, 35, (1958).
- 31 - D.J. PERKINS, Biochem. J., 80, 668, (1961).
- 32 - D.J. PERKINS, Biochem. J., 84, 152, (1962).
- 33 - I.R. HELD et S. FREEMAN, J. appl. Physiol., 19, 292, (1964).
- 34 - S. LUDEWIG, A. CHANUTIN et A.U. MASKET, J. Biol. Chem., 143, 753, (1942).
- 35 - M. BREEN et S. FREEMAN, Clin. Chim. Acta, 6, 181, (1961).
- 36 - C. TANFORD, J. am. Chem. Soc., 72, 441, (1950).
- 37 - G. SCATCHARD et W.T. YAP, J. am. Chem. Soc., 86, 3434, (1964).
- 38 - J. NEEL et J. BERTEAUX, J. Chim. Phys., 908, (1960).
- 39 - C. TANFORD, J. am. Chem. Soc., 73, 2066, (1951).
- 40 - C. TANFORD, J. am. Chem. Soc., 74, 211, (1952).
- 41 - M. S.N. RAO et H. LAL, J. am. Chem. Soc., 80, 3222, (1958).
- 42 - A.W. GIROTTI, Univ. of Massachusetts, Ph D, (1965).
- 43 - G.A.J. Van OS et J.H.M. KOOPMAN van ENVEN, Rec. trav. Chim., 76, 390, (1957).
- 44 - H. BENHOLD, E. KYLIN, S.T. RUSZNYAK, Die Eirveisskörper des Blutplasmas, T. STEINKOPFF, Dresden, 220, (1938).
- 45 - N. KAMENKA, B. BRUN, J. SALVINIEN, C.R. Acad. Sc. Paris, t 263, 1279, (1966).
- 46 - O. JARDETSKY, Ad. Chem. Phys., 7, 499, (1964).
- 47 - J.J. FISCHER et O. JARDETSKY, J. am. Chem. Soc., 87, 3237, (1965).
- 48 - J.C. MECALFE, A.S.V. BURGEM et O. JARDETSKY, dans "Molecular Associations in Biology, B. PULLMAN, Acad. Press. New York (1968).
- 49 - J. EISINGER, R.G. SHULMAN et B.M. SZYMANSKY, J. Chem. Phys., 36, 1721, (1962).
- 50 - M. COHN, Biochemistry, 2, 623, (1963).



- 51 - W.J. O'SULLIVAN et M. COHN, J. Biol. Chem., 241, 3104, (1966).
- 52 - W.J. O'SULLIVAN et M. COHN, J. Biol. Chem., 241, 3116, (1966).
- 53 - M. COHN et A.S. MILDVAN, J. Biol. Chem., 241, 1175, (1966).
- 54 - J. ETTORI et S.M. SCOGGAN, Arch. of Biochem. Biophys., 78, 213,  
(1958).
- 55 - J. ETTORI et S.M. SCOGGAN, Arch. of Biochem. Biophys., 91, 27,  
(1960).
- 56 - A. KEPES, Cr. Acad. Sci. Paris, 239, 117, (1954).
- 57 - A. KEPES, Cr. Acad. Sci. Paris, 239, 198, (1954).
- 58 - W.L. HUGHES, J. am. Chem. Soc., 69, 1836, (1947).
- 59 - H. LAL et M.S.N. RAO, J. am. Chem. Soc., 79, 3050, (1957).
- 60 - H. LAL et M.S.N. RAO, J. am. Chem. Soc., 80, 3226, (1958).
- 61 - H. WALDMAN-MEYER, J. Biol. Chem., 11, 3337, (1960).
- 62 - J.F. FOSTER, "Plasma Albumin" dans the Plasma Proteins, F.W. PUTNAM,  
Acad. Press. New York, (1960).
- 63 - SEGAL, Globular Protein Molecules, Pergamon Press, (1960).
- 64 - SPRINGALL, The Structural Chemistry of Proteins, Butterworths Scien.  
Pub. (1954).
- 65 - R. APHELPS et F.W. PUTNAM, dans "The Plasma Proteins" F.W. PUTNAM,  
Acad. Press. New York (1960).
- 66 - T. PETERS et C. HAWN, J. Biol. Chem., 242, 1566, (1967).
- 67 - J. VON, Structure et Dynamique conformationnelle des Protéines,  
HERMAN, Paris, (1969).
- 68 - C. TANFORD, S.A. SWANSON, W.S. SHORE, J. am. Chem. Soc., 77, 6414,  
(1955).
- 69 - M. LAKOWSKI Jr. et H.A. SCHERAGA, J. am. Chem. Soc., 76, 6305, (1954).
- 70 - C. TANFORD, J. Phys. Chem., 59, 788, (1955).
- 71 - C. TANFORD, J. am. Chem. Soc., 79, 5340, (1957).
- 72 - C. TANFORD et J.G. KIRKWOOD, J. am. Chem. Soc., 79, 5333, (1957).
- 73 - K. AOKI et J.F. FOSTER, J. am. Chem. Soc., 79, 3385, (1957).
- 74 - K. AOKI et J.F. FOSTER, J. am. Chem. Soc., 79, 3393, (1957).
- 75 - C.W. CARR, Arch. Biochem. Biophys., 40, 286, (1952).
- 76 - I.M. KLOTZ et J. I'ROUHART, J. Phys. Chem., 53, 100, (1949).
- 77 - C.W. CARR, Arch. Biochem. Biophys., 62, 476, (1956).
- 78 - R.H. DOREMUS, P. JOHNSON, J. Phys. Chem., 62, 203, (1958).
- 79 - PRIBRAM, Ber. Sächs. Ges. (Akad) wiss, 23, 279, (1871).
- 80 - F.C. Mc LEAN et A.B. HASTINGS, J. Biol. Chem., 108, 285, (1935).
- 81 - S. KATZ et I.M. KLOTZ, Arch. Biochem. Biophys., 44, 351, (1953).



- 82 - C.W. CARR, Arch. Biochem. Biophys., 43, 147, (1953).
- 83 - J.T. EDSALL et J. WYMAN, Biophysical Chemistry, Acad. New York, p.615, (1958).
- 84 - C.W. CARR et K.R. WOODS, Arch. Biochem. Biophys., 55, 1, (1955).
- 85 - H.A. SAROFF et M.S. LEWIS, J. Phys. Chem., 67, 1211, (1963).
- 86 - N. KAMENKA, B. BRUN, J. SALVINIEN, C.R. Acad. Sc. Paris, t. 269, 65, (1969).
- 87 - SHUBERT, J. am. Chem. Soc., 74, 3529, (1952).
- 88 - A. KETZ et J.W. MAHL, J. am. Chem. Soc., 77, 5764, (1955).
- 89 - F.R.N. GURD, J. Phys. Chem., 58, 788, (1954).
- 90 - H.A. SAROFF et H.J. MARK, J. am. Chem. Soc., 75, 1420, (1953).
- 91 - C. TANFORD, J. am. Chem. Soc., 74, 211, (1952).
- 92 - M.S.N. RAO et H. LAL, J. am. Chem. Soc., 80, 3226, (1958).
- 93 - J.H. WANG, J. am. Chem. Soc., 76, 1528, (1954).
- 94 - A.E. MARCINKOWSKY, F. NELSON, K.A. KRAUS, J. Phys. Chem., 69, 303, (1965).
- 95 - I.M. KLOTZ et H.A. FIESS, J. Phys. Colloid. Chem., 55, 102, (1951).
- 96 - J.A. CASTLEDEN et R. FLEMING, J. Pharm. Pharmacol., Suppl., 18, 58-71 (1966).
- 97 - J.T. EDSALL, Aspects actuels de la biochimie des acides aminés et des protéines, Masson ed., Paris (1958).
- 98 - FREEMAN, Advances in Protein Chemistry, 22, 282, (1967).
- 99 - C. PERCHARD et A. NOVAK, J. Chim. Phys., 65, 1964, (1968).
- 100 - R.H. CARLSON et T.L. BROWN, Inorg. Chem., 5, 268, (1966).
- 101 - J.T. EDSALL, G. FELSENFELD, D.S. GOODMAN, F.R.N. GURD, J. am. Chem. Soc., 76, 3054, (1954).
- 102 - A. CHAKRAVORTY et F.A. COTTON, J. Phys. Chem., 68, 2878, (1963).
- 103 - N.C. LI, J.M. WHITE, E. DOODY, J. am. Chem. Soc., 76, 6219, (1954).
- 104 - S.M. WANG et N.C. LI, J. am. Chem. Soc., 88, 4392, (1966).
- 105 - I.M. KLOTZ, J.L. FALLER, J.M. URQUHART, J. Phys. Colloid. Chem., 54 18, (1950).
- 106 - I.M. KLOTZ, J.M. URQUHART, H.A. FIESS, J. am. Chem. Soc., 74, 5537, (1952).
- 107 - I.M. KLOTZ, J.M. URQUHART, T.A. KLOTZ, J. AYERS, J. am. Chem. Soc., 77, 1919, (1955).



- 108 - I.M. KOLTHOFF, B.R. WILLEFORD, J.am. Chem. Soc., 80, 5673, (1958).
- 109 - T. PETERS, Biochim. Biophys. Acta, 39, 546, (1960).
- 110 - E. BRESLOW, J. Biol. Chem., 239, (10), 3252, (1964).
- 111 - T. PETERS, F.A. BLUMENSTOCK, J. Biol. Chem., 242, 1574, (1967).
- 112 - H. DAURES, D.E.A. Faculté des Sciences, Montpellier, (1970).





Vu et permis d'imprimer

Montpellier, le

Le Doyen de la Faculté  
des Sciences











